

BS

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 957 165 A2

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:  
17.11.1999 Patentblatt 1999/46

(21) Anmeldenummer: 99112607.9

(22) Anmeldetag: 01.12.1998

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 15/12, C12N 15/65,  
C12N 15/67, C12N 15/85,  
C12N 15/90, C12N 5/10,  
C07K 14/505, C12Q 1/68

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 01.12.1997 EP 97121075

(62) Dokumentnummer(n) der früheren Anmeldung(en)  
nach Art. 76 EPÜ:  
98122807.5 / 0 919 619

(71) Anmelder: Roche Diagnostics GmbH  
68305 Mannheim (DE)

(72) Erfinder:

- Honold, Konrad  
82377 Penzberg (DE)
- Holtschke, Thomas  
81369 München (DE)
- Stern, Anne  
82377 Penzberg (DE)

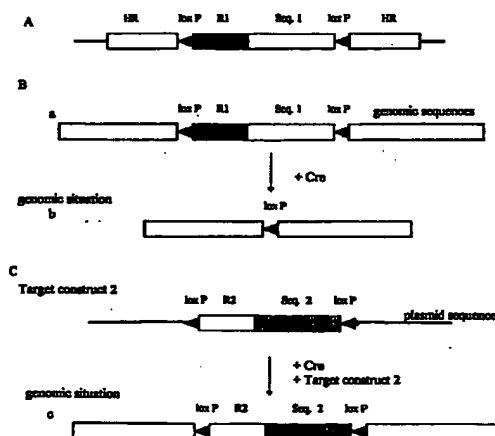
(74) Vertreter:

Weiss, Wolfgang, Dipl.-Chem. Dr. et al  
Patentanwälte  
Welckmann & Partner,  
Postfach 86 08 20  
81635 München (DE)

## (54) Optimierung von Zellen für die endogene Genaktivierung

(57) Die Erfindung betrifft Verfahren zur Optimierung der Genexpression in Zellen. Ein erster Aspekt betrifft ein Verfahren zum Verändern der Expression eines in einer eukaryontischen Zelle endogen vorliegenden Zielgens durch Einführen einer heterologen Expressionskontrollsequenz in das Genom der Zelle mittels homologer Rekombination, sowie das durch eine ortsspezifische Rekombinase vermittelte Herausschneiden der inserierten Fremd-DNA und ihr Ersetzen durch weitere heterologe Expressionskontrollsequenzen oder/und Amplifikationsgene. Weiterhin betrifft die Erfindung das Einführen einer oder mehrerer Nukleinsäuresequenzen, an die ein Aktivatorprotein oder ein Aktivatorproteinkomplex, z.B. ein Hypoxia-Inducible-Factor (HIF) bindet, in das Genom einer eukaryontischen Zelle durch homologe Rekombination, um die Expression eines Zielgens zu verändern. Desweiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Testen des Einflusses 5'-seitig oder 3'-seitig nicht kodierender Nukleinsäurefragmente auf die Expression eines Zielgens durch Bestimmen der Expression eines Reportergens. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Bereitstellung einer Rekombinase-Zielsequenz enthaltende DHFR-negative eukaryontische Zelle sowie die Expression einer in der Rekombinase-Zielsequenz inserierten Nukleinsäuresequenz.

Fig. 1



EP 0 957 165 A2

BEST AVAILABLE COPY

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Verfahren zur Optimierung der Genexpression in Zellen. Ein erster Aspekt betrifft ein Verfahren zum Verändern der Expression eines in einer eukaryontischen Zelle endogen vorliegenden Zielgens durch Einführen einer heterologen Expressionskontrollsequenz oder/und eines Amplifikationsgens in das Genom der Zelle mittels homologer Rekombination, sowie das durch eine ortsspezifische Rekombinase vermittelte Herausschneiden der inserierten Fremd-DNA und ihr Ersetzen durch weitere heterologe Expressionskontrollsequenzen oder/und Amplifikationsgenen. Weiterhin betrifft die Erfindung das Einführen einer oder mehrerer Nukleinsäuresequenzen, an die ein Aktivatorprotein oder ein Aktivatorproteinkomplex, z.B. ein Hypoxia-Inducible-Factor (HIF) bindet, in das Genom einer eukaryontischen Zelle durch homologe Rekombination, um die Expression eines Zielgens zu verändern. Desweiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Testen des Einflusses 5'-seitig oder 3'-seitig nicht kodierender Nukleinsäurefragmente auf die Expression eines Zielgens durch Bestimmen der Expression eines Reportergens. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Bereitstellung einer Rekombinase-Zielsequenz enthaltende DHFR-negative eukaryontische Zelle sowie die Expression einer in der Rekombinase-Zielsequenz inserierten Nukleinsäuresequenz.

[0002] Die Genexpression in einer Zelle kann konstitutiv, beispielsweise bei sogenannten Housekeeping-Genen, oder reguliert erfolgen. Die regulierte Expression ist insbesondere für Gene notwendig, die nur in einem bestimmten Entwicklungsstadium der Zelle oder bei einer Änderung der Umweltbedingungen exprimiert werden müssen.

[0003] Die Expression wird auf der Transkriptionsebene durch den operativ mit der kodierenden Nukleinsäuresequenz verbundenen Promotor reguliert, dessen Aktivität durch Repressoren und Aktivatoren gesteuert werden kann. Eine Bindung von Repressoren bzw. Aktivatoren an nichtkodierende Nukleinsäuresequenzen des Gens kann eine Verminderung bzw. Erhöhung der Aktivität des Promotors bewirken (L. Stryer, Biochemie, Kapitel 12, Spektrum der Wissenschaft, Verlagsgesellschaft, Heidelberg, 1990). Die Menge der in einer Zelle enthaltenen Repressoren bzw. Aktivatoren wird wiederum durch Faktoren, wie beispielsweise Umweltbedingungen, reguliert. Ein Beispiel für Aktivatoren sind die Hypoxia-Inducible-Faktoren (HIF), die durch vermindertes O<sub>2</sub>-Angebot induziert werden und zu einer erhöhten Expression des Erythropoietingens führt (Blanchard K.L. et al., Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: Cooperation between the promotor and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements, (1992), Mol.Cell.Biol. 12, 5373-5385; Wang G.L. and Semenza G.L., Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia, (1993), J.Biol.Chem., 268, 21513-21518; Wang G.L. et al., Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension, (1995), Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 92, 5510-5514).

[0004] Desweiteren ist die Menge eines exprimierten Proteins von der Stabilität der mRNA abhängig. Im 3'-seitigen Bereich einer mRNA sind Erkennungssequenzen für mRNA abbauende Enzyme lokalisiert, die die Stabilität der mRNA und somit die Expressionshöhe beeinflussen (Shaw G. and Kamen R., A Conserved AU Sequence from the 3' Untranslated Region of GM-CSF mRNA Mediates Selective mRNA Degradation, Cell (1986), 659-667). Die Halbwertszeit der mRNA korreliert dabei mit der Menge exprimierten Proteins. Eine dritte Ebene der Expressionsregulation ist die Translation.

[0005] Die Expression eines Gens unterliegt somit komplexen Regulationsmechanismen, die im Einzelfall sehr unterschiedlich sein können.

[0006] Proteine können mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technologie gewonnen werden, welche die Kenntnisse der Expressionsregulation nutzt (Sambrook et al., 1989 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor). Hierzu werden Vektoren verwendet, die eine das entsprechende Protein kodierende Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines geeigneten Promotors enthalten, sowie weitere für die Expression des Proteins und zur Replikation des Vektors notwendige Sequenzen. Der Vektor wird dann mittels bekannter Verfahren in eine Wirtszelle eingebracht, die Zelle wird kultiviert und das rekombinante Protein kann aus der Zelle oder dem Kulturmedium gewonnen werden.

[0007] Als Wirtszelle können prokaryontische oder eukaryontische Zellen verwendet werden. Prokaryontische Zellen, insbesondere E.coli-Zellen, sind in ihrer Handhabung unproblematisch, weisen aber bei einer rekombinanten Expression von eukaryontischen Proteinen eine Reihe von Nachteilen auf.

[0008] Prokaryonten und Eukaryonten unterscheiden sich im Expressionsprozessierungsweg, in den Zellmilieubedingungen sowie in den bei der Proteinprozessierung beteiligten Chaperons. Deshalb können in einem in Prokaryonten hergestellten eukaryontischen Protein entscheidende Unterschiede im Vergleich zu dem entsprechenden nativen Protein auftreten. Beispielsweise kann das Proteinfaltungsmuster und die Aktivität des Proteins verändert sein. Auch werden Proteine in einer prokaryontischen Wirtszelle in der Regel nicht glycosyliert. Ein korrektes Glycosylierungsmuster stellt aber in vielen Fällen, beispielsweise bei der Herstellung von Proteinen für eine pharmazeutische Formulierung, ein entscheidendes Merkmal für die Wirksamkeit und Verträglichkeit dar.

[0009] Glycosylierte Proteine werden deshalb mittels eukaryontischer Wirtszellen oder Zelllinien, beispielsweise CHO (Chinese Hamster Ovary) Zellen, hergestellt. Trotz der Verwendung eukaryontischer Zellen können aufgrund von Speziesunterschieden, beispielsweise bei der Expression eines humanen Proteins in nichthumanen Zellen, Veränderungen in dem rekombinant hergestellten Protein auftreten, wodurch dieses für viele Anwendungen unbrauchbar wird.

[0010] Zur rekombinanten Herstellung von Proteinen werden Wirtszellen transient oder stabil mit Expressionsvektoren transfiziert, wobei insbesondere bei großtechnischen Herstellungsverfahren stabil transfizierte Zellen verwendet werden.

5 [0011] Die unspezifische, zufällige Integration der Expressionsvektorsequenzen in das Genom der Wirtszelle kann zu Zellen mit geringer Produktionsleistung oder instabilen Eigenschaften der Zellen führen. Beispielsweise kann im Laufe des Produktionsprozesses die Produktionsleistung sinken oder die Fähigkeit der Zellen das rekombinante Protein zu exprimieren ganz verloren.

[0012] Ein Verfahren zur Erhöhung der Genexpression stellt die Genamplifikation dar, bei der eine für ein Protein kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem Amplifikationsgen gekoppelt wird. Durch einen Selektionsschritt erreicht man eine Vervielfältigung beider Sequenzen, die zu einer erhöhten Expression führt (Schimke R.T. (Ed.) (1982), Gene amplifikation, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY).

[0013] Als Amplifikationsgen kann beispielsweise eine für eine Dihydrofolatreduktase (DHFR) kodierende Nukleinsäure verwendet werden (Kaufmann R.J., Sharp P.A. (1982), Amplifikation and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene, J. Mol. Biol. 159:601ff).

15 [0014] Durch einen mit Methotrexat durchgeführten Selektionsschritt erhält man Zellen, die gegenüber Methotrexat resistent sind und in ihrem Genom die für eine DHFR-kodierende und mit ihr gekoppelte Nukleinsäuresequenz in 20 bis 50-facher Amplifikation enthalten (R. Knippers, 1982, Molekulare Genetik, Thieme, Stuttgart).

[0015] Ein derartiges Genamplifikationsverfahren wird am effektivsten mit einer DHFR-negativen Zelle durchgeführt. JP-62265992 beschreibt z.B. eine humane DHFR-negative Zelle. Ein Hinweis auf eine ortsspezifische Integration eines Expressionsvektors mittels homologer Rekombination und Amplifikation dieser Sequenzen in dieser Zelle findet sich darin jedoch nicht.

[0016] Auch bei der Durchführung eines Genamplifikationsverfahrens können aufgrund zufälliger Integration des Expressionsvektors in das Genom der Zelle die oben dargestellten Nachteile, wie beispielsweise Instabilität der Zellen, auftreten.

25 [0017] Lediglich bei einer ortsspezifischen Integration von Fremd-DNA an einem ausgewählten Genlocus durch homologe Rekombination, die zu einer endogenen Genaktivierung führt, können die beschriebenen Nachteile vermieden werden. Entsprechende Verfahren sind bekannt und werden als Gentergeting bezeichnet (WO 90/11354; WO 91/09955). Dabei wird die Zelle mit einem Vektor transfiziert, der ein positives Selektionsmarkergen enthält, flankiert von Nukleinsäuresequenzen, die homolog zu Sequenzen eines Genlocus sind, an dem der Vektor in das Genom der Zelle integriert werden soll. Zwischen den homologen Nukleinsäuresequenzen befindet sich weiterhin eine heterologe Expressionskontrollsequenz, um die Expression des Zielgens in der Zelle zu erhöhen, und gegebenenfalls ein Amplifikationsgen, um die Kopienzahl des Zielgens zu vergrößern.

[0018] Ein Nachteil bisher bekannter Gentergeting-Verfahren besteht darin, daß die Herstellung von Zellen mit Eigenschaften, die die Herstellung eines gewünschten Proteins in einer für kommerzielle Zwecke ausreichenden Menge und Qualität ermöglichen, oft mit sehr hohem Aufwand verbunden ist. Insbesondere die Auswahl von optimalen Expressionskontrollsequenzen oder/und Amplifikationsgenen für die Expression eines gewünschten Zielproteins erfordert oft eine beträchtliche Anzahl von Versuchsreihen zur homologen Rekombination, die aufgrund der aufwendigen Prozedur zur Isolierung von Klonen, in denen das gewünschte Rekombinationseignis stattgefunden hat, mit sehr hohem Aufwand verbunden sind.

40 [0019] Die homologe Rekombination kann auch verwendet werden, um die Expression bestimmter Gene in einer Zelle auszuschalten und Protein-Funktionsstudien durchzuführen. Hierzu werden Knockout-Mäuse erzeugt, indem das für ein zu untersuchendes Protein kodierendes Gen in embryonalen Stammzellen durch homologe Rekombination ausgeschaltet wird. Nach Durchführung weiterer Verfahrensschritte werden Mäuse erhalten, die aufgrund der Inaktivierung beider Allele dieses Gens vom Beginn ihrer Entwicklung kein funktionelles Protein exprimieren können (Thomas K.R., Capecchi M.R., (1987), Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells, Cell 51: 503-512).

45 [0020] Um ein bestimmtes Gen gewebe- und zeitspezifisch auszuschalten und zu untersuchen, kann das Cre-Lox-System eingesetzt werden. Hierbei wird ein von zwei loxP-Sequenzen flankiertes Nukleinsäurefragment durch homologe Rekombination in das Genom einer Zelle eingebracht und kann anschließend durch eine in der Zelle exprimierte Cre-Rekombinase wieder aus dem Genom herausgeschnitten werden (Sauer B, Henderson N (1989): Site-specific DNA recombination at loxP sites placed into the genome of mammalian cells. Nuc Acid Res 17:147-161; Sauer B., Henderson N. (1990), Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic genome by the Cre recombinase, New Biol. 5:441-449). Ein Hinweis auf eine Verwendung des Cre-lox-Systems oder eines anderen ortsspezifischen Rekombinationssystems für die ortsspezifische Integration von Expressionskontrollsequenzen oder Amplifikationsgenen in das Genom von eukaryontischen Zellen zur Veränderung der endogenen Genexpression findet sich im Stand der Technik nicht.

55 [0021] Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe bestand darin, ein neues Verfahren zur Optimierung der endogenen Genaktivierung durch homologe Rekombination bereitzustellen, bei dem die Nachteile des Standes der Technik zumindest teilweise beseitigt werden.

[0022] Diese Aufgabe wird gelöst durch Bereitstellung neuer Verfahren und Vektorkonstrukte, die eine Optimierung der Expressionsleistung von Genen in eukaryontischen Zellen ganz erheblich erleichtern. Ein erster Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zum Verändern der Expression einer in einer eukaryontischen Zelle endogen vorliegenden Nukleinsäuresequenz, das dadurch gekennzeichnet ist, daß

(a) die Zelle transfiziert wird mit einem ersten Vektor, umfassend

(i) mindestens eine Sequenz ausgewählt aus einer ersten heterologen Expressionskontrollsequenz und einem ersten Amplifikationsgen,

(ii) ein positives Selektionsmarkergen,

(iii) mindestens zwei die Sequenzen (i) und (ii) flankierende Zielsequenzen für eine ortsspezifische Rekombinase,

(iv) die Sequenzen (i), (ii) und (iii) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einem Nukleinsäureabschnitt im Genom der Zelle sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben,

(b) die transfizierte Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen eine homologe Rekombination des Vektors erfolgt, und

(c) die gemäß Schritt (b) erhaltene Zelle gewonnen wird.

[0023] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird eine Zelle bereitgestellt, die ein endogenes Gen in operativer Verknüpfung mit einer heterologen Expressionskontrollsequenz oder/und einem Amplifikationsgen aufweist, wobei diese Sequenzen flankiert sind von Zielsequenzen für eine ortsspezifische Rekombinase, z.B. der Cre-Rekombinase. Diese Zelle eignet sich hervorragend für Untersuchungen zur Optimierung der Expression des Zielgens, da aufgrund des Vorhandenseins der Zielsequenzen für die ortsspezifische Rekombinase ein einfaches Ersetzen der ersten heterologen Expressionskontrollsequenz oder/und des ersten Amplifikationsgens durch eine zweite heterologe Expressionskontrollsequenz oder/und ein zweites Amplifikationsgen möglich ist.

[0024] Die Bezeichnung "ortsspezifische Rekombinase" gemäß vorliegender Erfindung umfaßt Proteine und Proteinkomplexe, die DNA-Umlagerungen an einer spezifischen DNA-Zielsequenz vermitteln, einschließlich ortsspezifischer Rekombinasen der Integrase- oder Resolvase-Invertase-Klassen (Stark et al., Trends Genet. 8 (1992), 432-439; Abremski und Hoess, Protein Engineering 5 (1992), 87-91; Khan et al., Nucleic Acids Res. 19 (1991), 851-860) und durch Intron-kodierte Endonukleasen vermittelte ortsspezifische Rekombination (Perrin et al., EMBO J. 12 (1993), 2939-2947). Bevorzugte Rekombinaseproteine werden ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus der FLP-Rekombinase des 2 µ Episoms von *Saccharomyces cerevisiae* (z.B. Falco et al., Cell 29 (1982), 573-584; Cox, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 4223-4227; Konsolaki et al., New Biologist 4 (1992), 551-557), der Cre-Rekombinase des *E. coli* Phagen P1 (z.B. Sauer und Henderson (1989) supra), der R-Rekombinase aus dem *Zygosaccharomyces rouxii* Plasmid pSR1 (Matsuzaki et al., J. Bacteriol. 172 (1990), 610-618), der A-Rekombinase aus dem *Kluyveromyces drosophilarius* Plasmid pKD1 (Chen et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986), 4471-4481), der A-Rekombinase aus dem *Kluyveromyces waltii*-Plasmid pKW1 (Chen et al., J. Gen. Microbiol. 138 (1992), 337-345), einer Komponente des λ-Int-Rekombinationssystems (Landy, Annu. Rev. Biochem. 58 (1989), 913-949) und einer Komponente des Gin-Rekombinationssystems des Phagen µ (Klippel et al., EMBO J. 12 (1993), 1047-1057). Darüber hinaus sind auch die im europäischen Patent EP-B-0 707 599 beschriebenen Fusionsproteine aus einer ortsspezifischen Rekombinase und einem nuklearen Rezeptor oder der ligandenbindenden Domäne davon geeignet. Besonders bevorzugt werden für das erfindungsgemäße Verfahren Zielsequenzen der Cre-Rekombinase, d.h. loxP-Sequenzen, verwendet.

[0025] Im Gegensatz zur rekombinanten Herstellung von Proteinen durch ortsunspezifische Integration heterologer Gene und den damit verbundenen Nachteilen werden mit dem erfindungsgemäßen Verfahren die Vorteile der ortsspezifischen endogenen Genaktivierung durch homologe Rekombination genutzt. Durch eine vereinfachte Auswahl geeigneter Kombinationen von heterologen Expressionskontrollsequenzen und Amplifikationsgenen erhält man mit hoher Wahrscheinlichkeit optimierte Herstellungsklone mit stabilen Eigenschaften, welche die Herstellung eines Proteins ermöglichen, das in seiner Struktur und Aktivität weitgehend mit dem nativen Protein übereinstimmt.

[0026] Die Auswahl geeigneter homologer Sequenzen, die die heterologe Expressionskontrollsequenz, das Amplifikationsgen, das positive Selektionsmarkergen und die Rekombinase-Zielsequenzen flankieren, erfolgt beispielsweise gemäß den in WO90/11354 und WO91/09955 beschriebenen Methoden.

[0027] Darüber hinaus können in den homologen Sequenzen auch Modifikationen enthalten sein, die im exprimierten Protein zu Mutationen, wie beispielsweise Punktmutationen, Insertionen oder/und Deletionen einzelner Aminosäuren oder ganzer Aminosäureabschnitte führen.

[0028] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird es somit möglich in einem einzigen Verfahrensschritt nicht nur die Expressionshöhe einer endogenen Nukleinsäuresequenz zu verändern, sondern gleichzeitig eine Mutation in den kodierenden Bereich der endogenen Nukleinsäuresequenz einzuführen. Somit ist das erfindungsgemäße Verfahren

besonders vorteilhaft bei der Herstellung von Proteinen für Arzneimittelanwendungen. Derartige Proteine sollen außer Mutationen zur Wirksamkeitsteigerung des Proteins keine weiteren Veränderungen im Vergleich zu nativen Proteinen aufweisen.

[0029] Erfindungsgemäß kann jede eukaryontische Zelle verwendet werden, vorzugsweise wird eine Säugerzelle, besonders bevorzugt eine humane Zelle verwendet. Das erfindungsgemäße Verfahren kann mit nichtimmortalisierten Zellen, z.B. Fibroblasten, aber auch mit immortalisierten Zellen, z.B. Tumorzelllinien, durchgeführt werden. Bevorzugt sind immortalisierte Zellen.

[0030] Die bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendeten Lösungen und Medien werden vorzugsweise so ausgewählt, daß im jeweiligen Verfahrensschritt optimale Bedingungen vorliegen. Die Kultivierung der Zellen erfolgt mit Medien, die alle für ein ausreichendes Zellwachstum nötigen Stoffe enthalten und gegebenenfalls gepuffert sind. Vorzugsweise sind die Zellen in serumfreiem Medium kultivierbar. Besonders bevorzugt ist die verwendete Zelle eine Namalwa-, HT1080 oder HeLa S3 Zelle.

[0031] Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Optimierung der Expression einer in der Zelle endogen vorliegenden Nukleinsäuresequenz, d.h. eines Zielgens durch Auswahl einer optimalen Expressionskontrollsequenz, eines optimalen Amplifikationsgens oder/und durch Auswahl einer optimalen Kombination von Expressionskontrollsequenz und Amplifikationsgen.

[0032] Als heterologe Expressionskontrollsequenz kann jede Nukleinsäuresequenz verwendet werden, die nach ihrer Integration in das Genom der Zelle die Expression des Zielgens beeinflusst. Dies umfaßt Nukleinsäuresequenzen, die direkte Wechselwirkungen mit Transkriptionskomponenten, wie beispielsweise Transkriptionsinitiationsfaktoren oder RNA-Polymerasen eingehen können und Nukleinsäuresequenzen, deren Einfluß auf die Transkription durch Wechselwirkungen mit Aktivatoren oder Repressoren vermittelt wird. Vorzugsweise umfaßt die heterologe Expressionskontrollsequenz einen Promotor/Enhancer, besonders bevorzugt virale Promotoren und am meisten bevorzugt einen CMV-Promotor.

[0033] Die heterologe Expressionskontrollsequenz kann auch eine 3'-nichtkodierende Sequenz umfassen. 3'-nichtkodierende Sequenzen können stabilisierend oder destabilisierend auf eine mRNA wirken und erhöhen bzw. erniedrigen somit ihre Halbwertszeit. Durch Einführen einer mRNA stabilisierenden Sequenz kann die Halbwertszeit einer mRNA und somit die Ausbeute des von ihr kodierten Proteins erhöht werden.

[0034] In einer bevorzugten Ausführungsform wird durch die homologe Rekombination eine endogene Expressionskontrollsequenz des Zielgens entfernt. Dies ist besonders vorteilhaft, wenn die endogene Sequenz eine Repressor bindende Sequenz umfaßt. Eine die Expression vermindernde Wirkung kann auch eine 3'-nichtkodierende Sequenz aufweisen, die destabilisierend auf die mRNA wirkt, wodurch die Menge an translatiertem Protein vermindert wird.

[0035] Weiterhin erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren die Auswahl eines optimalen Amplifikationsgens. Das Amplifikationsgen wird vorzugsweise in einer exprimierbaren Form, d.h. in operativer Verknüpfung mit einem geeigneten Promotor eingesetzt und im Vektor so angeordnet, daß es sich nach der homologen Integration des Vektors in das Genom der eukaryontischen Zelle in räumlicher Nähe zum Zielgen befindet. Die Durchführung eines Amplifikations-schrittes führt zu einer Erhöhung der Anzahl von Kopien des Zielgens in der Zelle. Hierdurch kann eine weitere Expressionssteigerung der endogenen Nukleinsäuresequenz erreicht werden. Beispiele für geeignete Amplifikationsgene sind Dihydrofolatreduktase (DHFR), Adenosindeaminase, Ornithindecarboxylase bzw. Muteine dieser Gene. Vorzugsweise ist das Amplifikationsgen ein DHFR-Gen oder eine mutierte Form davon (Simonsen et al., Nucleic Acids Res. 1988, 16 (5): 2235-2246), insbesondere bei Zellen, die ein endogenes DHFR-Gen enthalten.

[0036] Als positiver Selektionsmarker kann jedes für eine eukaryontische Zelle geeignete Resistenzgen verwendet werden, welches zu einem selektierbaren Phänotyp führt, wie z.B. eine Antibiotikumresistenz. Vorzugsweise ist das positive Selektionsmarkergen ein Neomycin-, Kanamycin-, Geneticin- oder Hygromycin-Resistenzgen. Vorzugsweise wird das positive Selektionsmarkergen in exprimierbarer Form, d.h. in operativer Verknüpfung mit einem geeigneten Promotor verwendet.

[0037] Wird ein negatives Selektionsmarkergen verwendet, so wird üblicherweise zusätzlich zu dem positiven Selektionsschritt ein zweiter negativer Selektionsschritt durchgeführt. Dies bietet den Vorteil, daß nach Durchführung der Selektionsschritte die identifizierten Klone einen geringeren Anteil falsch-positiver Klone, d.h. zufällig in das Genom integrierte Vektoren, enthalten. Das negative Selektionsmarkergen ist vorzugsweise ein Thymidin-Kinase-Gen (TK) oder/und ein Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen (HGPRT).

[0038] Aufgrund des Vorhandenseins der Zielsequenzen der ortsspezifischen Rekombinase können zwischen diesen Sequenzen lokalisierten Nukleinsäuresequenzen aus dem Genom der Zelle unter Verwendung der ortsspezifischen Rekombinase herausgeschnitten werden. Vorzugsweise wird die zwischen den Zielsequenzen lokalisierte Nukleinsäuresequenz aus dem Genom durch transiente Aktivierung der entsprechenden Rekombinase in der Zelle herausgeschnitten. Diese transiente Aktivierung der Rekombinase kann beispielsweise erfolgen durch

(a) Transfizieren der Zelle mit einem zweiten Vektor, umfassend eine für die Rekombinase kodierende Nukleinsäuresequenz operativ verbunden mit einer in dieser Zelle aktiven oder aktivierbaren Expressionskontrollsequenz und

(b) Kultivieren der so transfizierten Zelle unter Bedingungen, unter denen die Rekombinase exprimiert wird und aktiv ist und

(c) gegebenenfalls Gewinnen der Zelle.

5 [0039] Bei Verwendung von Rekombinase/Nuklearer Rezeptor-Fusionsproteinen kann die transiente Aktivierung der Zelle auch durch gesteuerte Zugabe des Liganden für den nuklearen Rezeptor erfolgen.

[0040] Nach Entfernen der zwischen den Zielsequenzen liegenden DNA kann die verbleibende Zielsequenz, z.B. die loxP-Sequenz, für weitere Verfahrensschritte genutzt werden.

[0041] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß

10

(a) die Zelle transfiziert wird mit einem dritten Vektor, umfassend

(i) mindestens eine Sequenz ausgewählt aus einer zweiten heterologen Expressionskontrollsequenz und einen zweiten Amplifikationsgen,

15

(ii) ein positives Selektionsmarkergen, das sich vorzugsweise von dem positiven Selektionsmarkergen des ersten Vektors unterscheidet und

(iii) mindestens zwei die Sequenzen (i) und (ii) flankierende Rekombinase-Zielsequenzen,

(b) die transfizierte Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen eine Integration der von den Zielsequenzen flankierten Sequenz in die Zielsequenz im Genom der Zelle erfolgt,

20

(c) die gemäß Schritt (b) erhaltene Zelle gewonnen wird und

(d) gegebenenfalls die Schritte (a) bis (c) mindestens einmal mit jeweils variierenden Expressionskontrollsequenzen oder/und Amplifikationsgenen wiederholt werden.

25

[0042] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können somit viele Expressionskontrollsequenzen, Amplifikationsgene oder Kombinationen von Expressionskontrollsequenzen und Amplifikationsgenen einfach und schnell getestet werden. Die Durchführung einer zeit- und kostenaufwendigen ortsspezifischen Integration für jede einzelne heterologe Expressionskontrollsequenz bzw. jedes einzelne Amplifikationsgen zur Ermittlung eines optimalen Expressions/Amplifikationsystems für jedes einzelne Zielgen entfällt somit.

30

[0043] Das positive Selektionsmarkergen in einem dritten Vektor unterscheidet sich vorzugsweise von dem eines ersten Vektors, um das Selektionsverfahren zu vereinfachen und die Zahl der falsch-positiven Klone zu minimieren.

[0044] Die Rekombinase-Zielsequenzen im erfindungsgemäß verwendeten Vektor können mit natürlich vorkommenden Zielsequenzen übereinstimmen oder gegebenenfalls Mutationen aufweisen, welche die Wirksamkeit der ortsspezifischen Rekombination nicht beeinträchtigen.

35

[0045] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Vektor für die homologe Rekombination, insbesondere für die ortsspezifische Einführung von Rekombinase-Zielsequenzen in das Genom einer Zelle, umfassend

(i) mindestens eine Sequenz ausgewählt aus einer Expressionskontrollsequenz und einem Amplifikationsgen,

(ii) ein positives Selektionsmarkergen,

40

(iii) mindestens zwei die Sequenzen (i) und (ii) flankierende Zielsequenzen für eine ortsspezifische Rekombinase,

(iv) die Sequenzen (i), (ii) und (iii) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einem Nukleinsäureabschnitt im Genom einer Zelle sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben, und

(v) gegebenenfalls ein negatives Selektionsmarkergen.

45

[0046] Alle erfindungsgemäßen Vektoren enthalten weiterhin vorzugsweise die für eine Propagierung und Vermehrung in geeigneten Wirtszellen nötigen Sequenzelemente, wie beispielsweise Replikationsursprung, Selektionsmarkergene etc.

[0047] Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Vektor, insbesondere für das Einführen von DNA in das Genom einer Zelle mittels eines ortsspezifischen Rekombinasesystems, umfassend

50

(i) mindestens eine Sequenz ausgewählt aus einer Expressionskontrollsequenz und einem Amplifikationsgen,

(ii) ein positives Selektionsmarkergen und

(iii) mindestens zwei die Sequenzen (i) und (ii) flankierende Rekombinase-Zielsequenzen.

55

[0048] Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine eukaryontische Zelle, vorzugsweise eine humane Zelle, die erhältlich ist durch ein wie oben beschriebenes Verfahren. Diese Zelle, z.B. eine humane Zelle, ist vorzugsweise dadurch gekennzeichnet ist, daß sie

- (a) mindestens eine chromosomal lokalisierte Sequenz ausgewählt aus einer heterologen Expressionskontrollsequenz und einem Amplifikationsgen in operativer Verknüpfung mit einer endogen vorliegenden Nukleinsäuresequenz enthält und wobei
- (b) diese Sequenz flankiert ist von Rekombinase-Zielsequenzen.

[0049] In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Verändern der Expression einer in einer eukaryontischen Zelle endogen vorliegenden Nukleinsäuresequenz, das dadurch gekennzeichnet ist, daß

- (a) die Zelle transfiziert wird mit einem Vektor, umfassend

- (i) mindestens eine ein Aktivatorprotein, z.B. einen Hypoxia-Inducible-Factor (HIF)-bindende Nukleinsäuresequenz,
- (ii) ein positives Selektionsmarkergen,
- (iii) die Sequenzen (i) und (ii) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einem Nukleinsäureabschnitt im Genom der Zelle sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben,

- (b) die transfizierte Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen eine homologe Rekombination des Vektors erfolgt, und

- (c) die gemäß Schritt (b) erhaltene Zelle gewonnen wird.

[0050] Durch genomische Integration einer Nukleinsäuresequenz, welche die Bindung eines oder mehrerer Aktivatorproteine (durch Bindung an die Nukleinsäuresequenz die Genexpression erhöhende Proteine), im Bereich der Expressionskontrollsequenz eines Zielgens, insbesondere in deren regulatorischen Bereichen, wird die Expression des Zielgens überraschenderweise nicht verringert, sondern es wird im Gegensatz dazu sogar möglich, durch geeignete Kulturbedingungen die Expression des endogen vorliegenden Zielgens zu erhöhen bzw. die Expression eines nichtexprimierten endogen vorliegenden Zielgens zu induzieren.

[0051] Beispiele für geeignete Aktivatorproteine sind die Hypoxia-Inducible-Faktoren HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  sowie der Interferon regulierte Faktor 1 (IRF-1), welcher durch die Bindung an die Interferon Konsensus-Sequenz (ICE) die Transkription erhöhen kann (Tanaka N., Kawakami T., Taniguchi T., Mol. Cell. Biol. (1993), Aug; 13(8): 4531-4538).

[0052] Nach operativer Verknüpfung einer oder mehrerer, einen HIF oder andere Aktivatorproteine bindenden Nukleinsäuresequenzen mit einem endogen vorliegenden Zielgen kann bei Auswahl geeigneter Kulturbedingungen die Expression des Zielgens reguliert werden. Dies bietet insbesondere bei einer großtechnischen Herstellung den Vorteil, daß die Expression eines Proteins zu einem für den Herstellungsprozeß optimalen Zeitpunkt induziert werden kann. Vorteilhaft ist dabei, daß die durchschnittliche Verweildauer des Syntheseproduktes im Kulturmediumüberstand verringert wird. Dadurch kann auch die Menge an unerwünschten Abbauprodukten des Proteins verringert werden. Dies wirkt sich positiv bei der Durchführung der anschließenden Reinigungsschritte aus, reduziert die Herstellungskosten und führt zu einem qualitativ verbesserten Endprodukt.

[0053] Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens genügt es, eine oder mehrere Aktivator-bindende Nukleinsäuresequenzen mit dem Zielgen operativ zu verknüpfen. Vorzugsweise werden zwei HIF-bindende Nukleinsäuresequenzen verwendet. Besonders bevorzugt wird die HIF-bindende Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der 53 bp Sequenz gemäß Sequenz ID NO. 1, der 43 bp Sequenz gemäß Sequenz ID NO. 2, einer zu diesen Sequenzen homologen Sequenz oder einer mit diesen Sequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisierenden Sequenz.

[0054] Die Verwendung von zwei HIF-bindenden Nukleinsäuresequenzen führt überraschenderweise zu einer synergistischen Wirkung. Dadurch wird eine stärkere Erhöhung der Expression endogener Nukleinsäuren erreicht, als bei Verwendung jeder dieser Sequenzen alleine.

[0055] Sofern erforderlich kann die Expression des Aktivatorproteins, welches an die im Bereich des Zielgens eingeführten Aktivatorsequenzen bindet, in der Zelle induziert oder/und erhöht werden. Dies kann beispielsweise erfolgen durch Transfizieren der Zelle mit einem Vektor, umfassend

- (i) eine für ein Aktivatorprotein kodierende Nukleinsäuresequenz, die operativ verbunden ist mit einer in dieser Zelle aktiven Expressionskontrollsequenz, und
- (ii) gegebenenfalls ein positives Selektionsmarkergen.

[0056] Es kann jede für ein Aktivatorprotein kodierende Nukleinsäuresequenz verwendet werden, deren Expressionsprodukt an die in das Genom integrierte Aktivatorbindende Nukleinsäuresequenz binden kann. Vorzugsweise ist das Aktivatorprotein ein HIF-1 $\alpha$  oder/und HIF-1 $\beta$ -Protein. Enthält die endogen vorliegende Nukleinsäuresequenz bereits Aktivator- oder vorzugsweise HIF-bindende Nukleinsäuresequenzen, kann es ausreichen, lediglich einen Vektor in die Zelle einzubringen, umfassend eine für ein Aktivator- oder vorzugsweise ein HIF-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz.

quenz, die operativ verbunden ist mit einer in der Zelle aktiven Expressionskontrollsequenz und gegebenenfalls ein positives Selektionsmarkergen.

[0057] Die mit der für das Aktivatorprotein kodierenden Nukleinsäuresequenz operativ verbundene Expressionskontrollsequenz kann induzierbar sein, so daß eine zusätzliche Möglichkeit der Aktivierung durch geeignete Kulturbedingungen, wie z.B. Zugabe von Hormonen oder Schwermetallen, erreicht werden kann. Dadurch wird es möglich, die Expression eines endogenen Zielgens zu einem für den Herstellungsprozeß optimalen Zeitpunkt zu induzieren.

[0058] Die Verwendung einer konstitutiv aktiven Expressionskontrollsequenz hat den Vorteil, daß das Aktivatorprotein unabhängig von der Zugabe von Aktivatoren in das Kulturmedium konstitutiv exprimiert wird.

[0059] Wenn die Aktivatorprotein-bindende Nukleinsäuresequenz eine HIF-bindende Nukleinsäuresequenz ist, kann beispielsweise die Expression des Zielgens durch geeignete Kulturbedingungen, z.B. bei einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 0,1 - 2% induziert werden.

[0060] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor für die homologe Rekombination, umfassend

- (i) mindestens eine ein Aktivatorprotein bindende Nukleinsäuresequenz,
- (ii) ein positives Selektionsmarkergen,
- (iii) die Sequenzen (i) und (ii) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einem Nukleinsäureabschnitt im Genom der Zelle sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben.

[0061] Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine eukaryontische Zelle, vorzugsweise eine humane Zelle, die erhältlich ist nach einem wie oben beschriebenen Verfahren. Diese Zelle ist vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens ein heterologes, chromosomal lokalisiertes, Aktivatorprotein/-komplex-bindendes Nukleinsäurefragment operativ verknüpft mit einem endogen in der Zelle vorliegenden Gen enthält. Mit Hilfe eines orts-spezifischen Rekombinationssystems - wie zuvor erläutert - können Aktivatorprotein-bindende Nukleinsäurefragmente im Genom ausgetauscht werden, so daß eine einfache Identifizierung einer für ein bestimmtes Zielgen optimalen Aktivatorsequenz möglich wird.

[0062] In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Testen des Einflusses von nicht-kodierenden Nukleinsäuresequenzen aus dem Bereich eines in einer eukaryontischen Zelle endogen vorliegenden Zielgens auf dessen Expression, das dadurch gekennzeichnet ist, daß

(a) die Zelle transfiziert wird mit einem Vektor, umfassend

- (i) eine heterologe in der Zelle aktive oder aktivierbare Expressionskontrollsequenz operativ verknüpft mit einem Reportergen, und
- (ii) 5'-seitig oder/und 3'-seitig nichtkodierende Nukleinsäurefragmenten aus dem Bereich des Zielgens,

(b) die Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen die Expressionskontrollsequenz aktiv ist und  
(c) die Expression des Reportergens gemessen wird.

[0063] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann einfach festgestellt werden, wie eine heterologe Expressionskontrollsequenz im Bereich des Zielgens im Genom plaziert werden muß, um eine optimale Expressionsrate des Zielgens zu bewirken und welchen Einfluß das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit 5'- oder/und 3'-nichtkodierender Sequenzen aus dem Bereich des Zielgens auf die Expression hat. Die Testvektoren werden vorzugsweise transient in Zellen transfiziert und die Expression des Reportergens wird bestimmt. Somit können schnell und kostengünstig viele Anordnungen einer heterologen Expressionskontrollsequenz und eines Zielgens bzw. viele verschiedene Expressionskontrollsequenzen getestet werden. Die heterologen Expressionskontrollsequenzen umfassen Nukleinsäuresequenzen, die direkte Wechselwirkungen mit Transkriptionskomponenten, wie beispielsweise Transkriptionsinitiationsfaktoren oder RNA-Polymerasen, eingehen können und Nukleinsäuresequenzen, deren Einfluß auf die Transkription durch Wechselwirkungen mit Aktivatoren oder Repressoren vermittelt wird. Vorzugsweise ist die heterologe Expressionskontrollsequenz ein Promotor/Enhancer, besonders bevorzugt ein viraler Promotor und am meisten bevorzugt ein CMV-Promotor. Insbesondere bei Verfahren, die weitere aufwendige Verfahrensschritte beinhalten, trägt das erfindungsgemäße Verfahren zu einer starken Kostensenkung bei. Dies ist beispielsweise bei der Herstellung transgener Tiere, wie Mäuse, Schafe oder Kühe der Fall, in denen die Expression einer bestimmten endogenen Nukleinsäuresequenz in einem bestimmten Zelltyp erhöht werden soll.

[0064] Das 5'-seitige bzw. 3'-seitige nichtkodierende Nukleinsäurefragment aus dem Bereich des Zielgens wird vorzugsweise in dem Vektor entsprechend seiner genomischen Anordnung 5'-seitig oder 3'-seitig des Reportergens angeordnet.

[0065] Es kann jedes dem Fachmann bekannte Reportergen verwendet werden, dessen Expression in der Zelle



nachweisbar ist. Vorzugsweise wird ein Reportergen verwendet, das für Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT),  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal) oder LacZ kodiert. Andererseits kann auch ein Reportergen kodierend für ein Protein von Interesse, z.B. EPO, verwendet werden, dessen Expression mit immunologischen Verfahren, z.B. ELISA, nachweisbar ist.

[0066] In einer bevorzugten Ausführungsform werden mindestens zwei Vektoren, die voneinander verschiedene 5'-seitige oder/und 3'-seitige nichtkodierende Nukleinsäurefragmente des Zielgens enthalten, in jeweils unterschiedliche Zellen transfiziert und die Expression des Reportergens der unterschiedlichen Zellen wird mit dem Fachmann bekannten Methoden bestimmt. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann leicht festgestellt werden, welche Anordnung der heterologen Expressionskontrollsequenz eine optimale Expression für eine bestimmte Wirtszelle ergibt.

[0067] In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Bereitstellung einer DHFR-negativen eukaryontischen Zelle, vorzugsweise einer Säugerzelle und besonders bevorzugt einer humanen Zelle, das dadurch gekennzeichnet ist, daß

(a) die Zelle transfiziert wird mit einem ersten Vektor, umfassend

(i) mindestens eine Zielsequenz für eine ortsspezifische Rekombinase,  
(ii) die Sequenz (i) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einer endogen in der Zelle vorliegenden DHFR-Nukleinsäuresequenz sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben, und  
(iii) gegebenenfalls ein positives und gegebenenfalls ein negatives Selektionsmarkergen,

(b) die transfizierte Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen eine homologe Rekombination des Vektors erfolgt, und

(c) die gemäß Schritt (b) erhaltene Zelle gewonnen wird.

[0068] In dem erfindungsgemäßen Verfahren werden die Rekombinase-Zielsequenzen und die homologen Sequenzen gemäß obigen Erläuterungen ausgewählt und verwendet.

[0069] Das positive Selektionsmarkergen wird - sofern vorhanden - zwischen den zu einem DHFR-Gen homologen Sequenzen angeordnet. Das negative Selektionsmarkergen wird - sofern vorhanden - außerhalb der homologen Sequenzen angeordnet.

[0070] Nach erfolgter homologer Rekombination in den DHFR-Locus kann kein funktionelles DHFR-Protein von der Zelle synthetisiert werden. Die Sequenzen des Vektors können dabei so angeordnet sein, daß der Promotor des DHFR-Gens inaktiviert wird oder/und daß aufgrund einer Insertion oder Deletion in der kodierenden Sequenz des DHFR-Gens kein funktionelles DHFR-Protein mehr synthetisiert werden kann.

[0071] Um beide Allele eines DHFR-Gens zu inaktivieren, werden die Zellen zunächst mit einem erfindungsgemäßen Vektor transfiziert, selektioniert und gewonnen. In diesen Zellen ist ein Allel des DHFR-Gens inaktiviert, d.h. sie sind heterozygot (+/-) für das DHFR-Gen. Dann können diese Zellen nochmals mit einem erfindungsgemäßen Vektor transfiziert werden, der vorzugsweise ein von dem ersten Vektor verschiedenes positives Selektionsmarkergen enthält. Nach einem Selektionsschritt werden Zellen gewonnen, in denen beide DHFR-Allele inaktiviert sind. Alternativ kann eine Erhöhung des Selektionsdrucks zu einer Genkonversion und damit zur Inaktivierung beider Allele führen (vgl. z.B. Mortensen et al., Mol. Cell. Biol. 12 (1992), 2391-2395).

[0072] Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine DHFR-negative Zelle bereit, deren Verwendung in einem Genamplifikationsverfahren den Vorteil hat, daß sie kein endogenes DHFR-Protein synthetisiert. Bei der Durchführung eines Selektionsschrittes zur Amplifikation einer heterologen Nukleinsäuresequenz, die mit einer für ein DHFR-Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz gekoppelt ist, kommt es zu keinen störenden Einflüssen des Expressionsproduktes des endogenen DHFR-Gens und somit zu einer Effizienzsteigerung der Genamplifikation.

[0073] Als positives Selektionsmarkergen kann jedes geeignete Selektionsmarkergen verwendet werden, welches zu einem selektierbaren Phänotyp führt, z.B. Antibiotikaresistenz. Vorzugsweise ist die für das positive Selektionsmarkergen kodierende Nukleinsäuresequenz ein Neomycin-, Kanamycin-, Geneticin- oder Hygromycin-Resistenzgen.

[0074] Es kann jedes dem Fachmann bekannte negative Selektionsmarkergen verwendet werden, vorzugsweise ist die für das negative Selektionsmarkergen kodierende Nukleinsäuresequenz ein Thymidin-Kinase-Gen (TK) oder/und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen (HGPRT).

[0075] Die von Rekombinase-Zielsequenzen flankierte Sequenz kann aus dem Genom der Zelle durch transiente Aktivierung der entsprechenden Rekombinase herausgeschnitten werden, z.B. durch

(a) Transfizieren der Zelle mit einem Vektor, umfassend eine für eine Rekombinase kodierende Nukleinsäuresequenz operativ verbunden mit einer in dieser Zelle aktiven Expressionskontrollsequenz,

(b) Kultivieren der so transfizierten Zelle unter Bedingungen, unter denen die Rekombinase exprimiert wird und aktiv ist, und

(c) gegebenenfalls Gewinnen der Zelle.

[0076] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es nicht nur möglich ein DHFR-Gen zu inaktivieren, sondern durch eine Rekombinase vermittelte Reaktion auch Sequenzen eines DHFR-Gens, die sich zwischen den Rekombinase-Zielsequenzen befinden, sowie das eingeführte Selektionsmarkergen aus dem Genom einer Zelle herauszuschneiden.

[0077] Wenn die von Rekombinase-Zielsequenzen flankierte Sequenz ein positives Selektionsmarkergen beinhaltet, ist die diese Sequenz enthaltende Zelle antibiotikumresistent. Sie kann somit leicht nach dem Fachmann bekannten Verfahren selektioniert werden.

[0078] Ein weiterer Vorteil einer nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten DHFR-negativen Zelle ist, daß ihre Eigenschaften durch dem Fachmann bekannte Methoden charakterisiert werden können und die Zellen anschließend für weitere Verfahren verwendet werden können. Darüber hinaus können durch die an dem DHFR-Genlocus eingeführte Rekombinase-Zielsequenz ortsspezifisch Nukleinsäuresequenzen in das Genom integriert werden.

[0079] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform betrifft ein Verfahren zum Einführen eines heterologen DHFR-Gens in eine eukaryontische Zelle, das dadurch gekennzeichnet ist, daß eine nach dem oben beschriebenen Verfahren erhaltene DHFR-negative Zelle

(a) transfiziert wird mit einem dritten Vektor, umfassend

(i) gegebenenfalls ein positives Selektionsmarkergen, das sich vorzugsweise von dem positiven Selektionsmarkergen des ersten Vektors unterscheidet,

(ii) eine für eine DHFR kodierende Nukleinsäuresequenz,

(iii) eine zu amplifizierende für ein Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in exprimierbarer Form und wobei die Nukleinsäuresequenz aus den Teilsequenzen (i), (ii) und (iii) 5'-seitig und 3'-seitig jeweils von mindestens einer Rekombinase-Zielsequenz flankiert ist,

(b) die transfizierte Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen eine Integration der von Rekombinase-Zielsequenzen flankierten Nukleinsäuresequenz an der bereits im Genom der Zelle befindlichen Rekombinase-Zielsequenz erfolgt und

(c) die gemäß Schritt (b) erhaltene Zelle gewonnen wird.

[0080] Das positive Selektionsmarkergen, das DHFR-Gen und das für das gewünschte Protein kodierende Zielgen sind vorzugsweise jeweils operativ mit einer in der Zelle aktiven oder aktivierbaren Expressionskontrollsequenz verbunden. Prinzipiell ist auch ein polycistronisches Konstrukt mit internen ribosomalen Bindestellen möglich. Die zu amplifizierende Nukleinsäuresequenz des Zielgens sollte jedoch durch einen separaten Promotor getrieben sein. Besonders bevorzugte Expressionskontrollsequenzen sind virale Promotoren/Enhancer. Am meisten bevorzugt ist zur Expression des Proteins ein CMV-Promotor.

[0081] Vorteilhaft ist, daß die erfindungsgemäße Integration heterologer Sequenzen in das Genom einer Zelle ortsspezifisch erfolgt und somit Interferenzen der heterologen Sequenzen mit genomischen Sequenzen ausgeschlossen sind. Die daraus resultierenden weiter oben beschriebenen Nachteile, wie beispielsweise instabile Herstellungsklone, können so vermieden werden.

[0082] Zur Steigerung der Expressionsrate einer heterologen für ein Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz kann ein Amplifikationsschritt mit Methotrexat nach bekannten Verfahrensschritten durchgeführt werden.

[0083] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, umfassend

(i) gegebenenfalls ein positives Selektionsmarkergen,

(ii) eine für ein DHFR kodierende Nukleinsäuresequenz, und

(iii) eine für ein gewünschtes Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in exprimierbarer Form, wobei die Nukleinsäuresequenz aus den Teilsequenzen (i), (ii) und (iii) 5'-seitig und 3'-seitig jeweils von mindestens einer Rekombinase-Zielsequenz flankiert ist.

[0084] Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor für die homologe Rekombination, umfassend

(i) gegebenenfalls ein positives Selektionsmarkergen,

(ii) mindestens jeweils eine Rekombinase-Zielsequenz, die die Sequenz (i) flankiert und

(iii) die Sequenzen (i) und (ii) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einer endogen in einer Zelle vorliegenden DHFR-Nukleinsäuresequenz sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben, und

(iv) gegebenenfalls ein negatives Selektionsmarkergen außerhalb, vorzugsweise 3'-seitig der homologen Sequenzen (iii).

[0085] Weiterhin betrifft die Erfindung eine eukaryontische Zelle, vorzugsweise eine humane Zelle, erhältlich durch ein oben beschriebenes Verfahren. Diese Zelle ist dadurch gekennzeichnet, daß

- (a) mindestens eine endogene, für eine DHFR kodierende Nukleinsäuresequenz inaktiviert ist, vorzugsweise beide endogenen Allele und
- (b) im Bereich dieser für DHFR kodierenden Nukleinsäuresequenz mindestens eine Rekombinase-Zielsequenz in das Genom integriert ist.

[0086] Schließlich noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine eukaryontische Zelle, vorzugsweise eine humane Zelle, die gekennzeichnet ist durch eine heterologe Nukleinsäuresequenz im Bereich eines endogenen DHFR-Genlocus umfassend

- (i) eine für eine DHFR kodierende Nukleinsäuresequenz,
- (ii) eine für ein gewünschtes Protein kodierende Nukleinsäuresequenz und
- (iii) mindestens eine Rekombinase-Zielsequenz.

[0087] Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele, Figuren und das Sequenzprotokoll erläutert.

#### Figurenbeschreibung

##### Figur 1

[0088]

(A) zeigt einen Vektor für die homologe Rekombination, der als erster Vektor verwendet wird. HR: homologe Sequenz, Seq 1: erste heterologe Expressionskontrollsequenz, R1: positives Selektionsmarkergen, loxP: loxP-Sequenz mit Orientierung,

(B) zeigt genomische Sequenzen

- (a) nach erfolgter homologer Rekombination,
- (b) nach durch eine Cre-Rekombinase katalysiertem Herausschneiden einer von loxP-Sequenzen flankierten Sequenz,

(C) zeigt einen Vektor für eine Cre-Rekombinase vermittelte Integration, der eine Sequenz zwischen loxP-Sequenzen angeordnet umfaßt,

(c) zeigt genomische Sequenzen nach Integration eines zweiten Vektors an der loxP-Sequenz. R2: positives Selektionsmarkergen, welches sich gegebenenfalls von R1 unterscheidet, Seq 2: zweite heterologe Expressionskontrollsequenz.

##### Figur 2

[0089]

(A) zeigt einen Vektor für die homologe Rekombination HR: homologe Sequenz, R-box: positives und gegebenenfalls negatives Selektionsmarkergen, loxP: loxP-Sequenz mit Orientierung, HSV-tk: Herpes simplex-Thymidinkinase;

(B) zeigt einen Vektor für die homologe Rekombination mit einseitiger homologer Sequenz.

##### Figur 3

[0090] zeigt die CMV-Promotor/HIF-kontrollierte Erythropoietin (EPO)-Expression von HeLa S3 Zellen, die transfiziert wurden mit den Vektoren pHYG, pHIF-1 $\alpha$  und pARNT (pHIF-1 $\beta$ ) und deren EPO-Expression 3, 4 und 5 Tage nach der Transfektion in den Zellüberständen gemessen wurde (Erythropoietinkonzentration in  $\mu\text{g/ml}$ ).

[0091] pHYG: Kontrollvektor, pHIF-1 $\alpha$ : eine HIF-1 $\alpha$  cDNA unter Kontrolle eines SR $\alpha$ -Promotors, pARNT: eine HIF- $\beta$  cDNA unter Kontrolle eines CMV-Promotors.

Figur 4

[0092] zeigt 4 verschiedene Vektoren, die jeweils einen CMV-Promotor (C) und das Reportergen  $\beta$ -Galactosidase (B) enthalten, wobei zwischen diesen Sequenzen unterschiedlich lange nichtkodierende Nukleinsäurefragmente des Zielgens (S) inseriert sind. Die Länge der nichtkodierenden Nukleinsäurefragmente beträgt dabei in den Vektoren A3-178 Okb, A3-177 2,5kb, A3-175 3,7kb und A3-181 5,7kb. Der Kontrollvektor pNASS $\beta$  enthält das Reportergen  $\beta$ -Galactosidase ohne CMV-Promotor.

Figur 5

[0093] zeigt eine Messung der Expression des Reportergens  $\beta$ -Galactosidase nach Transfektion von HeLa S3 Zellen mit den Vektoren der Figur 4 in einer Verdünnungsreihe (1:2 bis 1:128).

Figur 6

[0094]

(A) zeigt den Vektor pNDI für die homologe Rekombination in einen DHFR-Genlocus. Ein positives Selektionsmarkergen (Neo) wird flankiert von zwei loxP-Sequenzen. 5'-seitig der einen loxP-Sequenz bzw. 3'-seitig der anderen loxP-Sequenz befinden sich die zu einem DHFR-Gen homologen Sequenzen (5'-, 3'-DHFR-Bereich).  
(B) zeigt den Vektor pHDI für die homologe Rekombination in einen DHFR-Genlocus. Ein positives Selektionsmarkergen (Hyg) wird flankiert von zwei loxP-Sequenzen. 5'-seitig der einen loxP-Sequenz bzw. 3'-seitig der anderen loxP-Sequenz befinden sich die zu einem DHFR-Gen homologen Sequenzen (5'-, 3'-DHFR-Bereich).

Figur 7

[0095]

(A) zeigt den genomischen Aufbau eines DHFR-Gens mit Exon 1, Exon 2 und Exon 3, sowie den dazwischen liegenden Introns,  
(B) zeigt schematisch einen Figur 6 entsprechenden Vektor, Targetkonstrukt,  
(C) zeigt die genomische Struktur nach erfolgter homologer Rekombination des Vektors für die homologe Rekombination in ein DHFR-Gen. Der Abstand zwischen den EcoRI-Schnittstellen beträgt bei Verwendung des Vektors pNDI 2,9 kb bzw. 3,7 kb bei Verwendung des Vektors pHDI. Neo: Neomycin, Hyg: Hygromycin, kb: Kilobasen

Figur 8

[0096] zeigt einen Vektor, der eine für ein Protein X kodierende Nukleinsäuresequenz und eine für ein DHFR-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz jeweils einschließlich regulatorischer Sequenzen umfaßt, die von zwei loxP-Sequenzen flankiert sind. Dieser Vektor kann zur Cre-Rekombinase katalysierten Integration in das Genom in eine loxP-Sequenz verwendet werden.

SEQ ID NO. 1 zeigt eine erste HIF-bindende Nucleotidsequenz,

SEQ ID NO. 2 zeigt eine zweite HIF-bindende Nucleotidsequenz,

SEQ ID NO. 3 zeigt eine loxP-Sequenz.

BEISPIELE

Beispiel 1 Expression eines Erythropoietin-Gens unter Kontrolle eines CMV-Promotors und Überexpression von HIF

[0097] Die Vektoren pHYG, pHIF-1 $\alpha$  und pARNT (vgl. Figur 3) werden in genetisch veränderte HeLa-S3 Zellen transfiziert. In den Zellen wurde proximal zu dem Erythropoietin-Gen (EPO)-Translationsstart eines EPO-Allels ein CMV (Cytomegalovirus) Promotor eingeführt, der die EPO-Expression kontrolliert. Die Zellen produzieren normalerweise 1  $\mu$ g Erythropoietin pro 24 Stunden pro  $10^7$  Zellen. Sie werden 24 Stunden vor der Transfektion mit einer Konzentration von  $6 \times 10^4$  Zellen pro 6 Lochplatte passagiert. Am Tag der Transfektion werden die Zellen mit einem DNA-DOTAP-Gemisch inkubiert. Das Gemisch enthält 1,25  $\mu$ g des jeweiligen Vektors, 10  $\mu$ l DOTAP (Boehringer Mannheim 1202375) ad 75  $\mu$ l in 20 mM Hepespuffer pro Loch. Das Gemisch wird für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die

Zellen werden dann in 3 ml Medium pro Loch mit dem DNA-DOTAP für 6 Stunden inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und in Vollmedium für 5 Tage kultiviert. Am Tag 3, 4 und 5 werden jeweils 100 µl Überstand entnommen und mit einem Erythropoietin ELISA analysiert. Der Assay ist am Tag 5 abgeschlossen und die Zellzahl wird bestimmt. Die Erythropoietinmenge pro Loch wird bezogen auf gleiche Zellzahl berechnet (vgl. Figur 3).

[0098] Das Beispiel zeigt, daß eine Induktion des Erythropoietingens durch HIF immer noch möglich ist, obwohl eine heterologe Expressionskontrollsequenz (CMV-Promotor) in die Promotorregion eines Allels des Erythropoietingens eingeführt wurde. Die gemessene Erhöhung der Erythropoietinkonzentration deutet auf eine synergistische Wirkung des Hypoxia-induzierten Faktors bzw. der Hypoxia-induzierten Faktoren auf beide Allele hin.

[0099] Es wird somit deutlich, daß die Expression einer endogenen Nukleinsäuresequenz durch Einführen einer heterologen Expressionskontrollsequenz erhöht werden kann. Wird ein Aktivator (HIF) in der Zelle exprimiert, für den in der Expressionskontrollsequenz bindende Nukleinsäuresequenz vorhanden sind, so kann die Expression dieses Gens weiter gesteigert werden. Sind entsprechende Sequenzen in diesem Genlocus nicht vorhanden, können sie gezielt durch das erfindungsgemäße Verfahren mittels homologer Rekombination in das Genom eingebracht werden.

#### **Beispiel 2 Optimierte Anordnung einer Expressionskontrollsequenz zur Erhöhung der Expression einer endogenen Nukleinsäure**

[0100] 5'-seitige Sequenzen eines endogenen Gens können sowohl die Expression stimulierende als auch reprimierende Eigenschaften aufweisen. Bei der Einführung einer heterologen Expressionskontrollsequenz in das Genom 5'-seitig eines Zielgens wird die Expressionshöhe durch die endogene 5'-seitige Sequenz beeinflusst. Soll eine optimale Expression des Zielgens mittels einer heterologen Expressionskontrollsequenz erreicht werden, muß diese so angeordnet werden, daß durch 5'-seitige nichtkodierende Sequenzen des Zielgens die Aktivität der heterologen Expressionskontrollsequenz nicht vermindert wird. Vorteilhaft wäre eine gezielte Anordnung, um synergistische Effekte der einzelnen Sequenzelemente zu erreichen. Um verschiedene Anordnungen der heterologen Expressionskontrollsequenz zu testen, d.h. um beispielsweise festzustellen in welcher Entfernung zum Translationsstart der kodierenden Sequenz des Zielgens die heterologe Expressionskontrollsequenz in das Genom der Zelle integriert werden muß, werden unterschiedliche Vektoren mit unterschiedlichen 5'-seitigen nichtkodierenden Nukleinsäurefragmenten des Zielgens getestet (vgl. Figur 4). Die in Figur 4 beschriebenen Vektoren werden in HeLa S3 Zellen transfiziert und die Expression des Reportergens  $\beta$ -Galactosidase wird gemessen (vgl. Figur 5).

[0101] 24 Stunden vor dem Assay werden die Zellen mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro 10 Zentimeter Petrischale passagiert. Am Tag der Transfektion werden die Zellen mit einem DNA-DOTAP-Gemisch inkubiert. Das Gemisch enthält 1 pmol des jeweiligen Vektors (A3-178, A3-177, A3-175, A3-181 bzw. pNASS $\beta$ , vgl. Figur 4) in 60 µl DOTAP (Boehringer Mannheim 1202375) ad 300 µl mit einer 20 mM HEPES-Puffer Lösung. Das Gemisch wird 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen werden in 6 ml serumfreiem Medium pro Petrischale mit DNA-DOTAP für 6 Stunden vorinkubiert. Danach werden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und in Vollmedium für 22 Stunden kultiviert. Um die  $\beta$ -Galactosidaseexpression zu messen, werden die Zellen in 200 µl PBS gewonnen und durch Gefrieren bei -20°C und Auftauen lysiert. 10 µl des Lysats werden 1 : 10 mit Substrat verdünnt (3,29 mM Chlorphenol Rot- $\beta$ -D-Galactopyranosid (Boehringer Mannheim 884308), 100 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% BSA, 0,1% TritonX-100, 0,1% Natriumazid, pH7. Die Proben werden in 1 : 2 Schritten verdünnt und in einer 96 Lochplatte bei 37°C inkubiert bis sich eine dunkelrote Farbe gebildet hat. Die Proben werden dann bei 570/580 nm oder 550 nm gemessen.

[0102] Wie aus Figur 5 deutlich wird, ist die Expression des Reportergens in Zellen am höchsten, die mit dem Vektor A3-178 transfiziert wurden. Die heterologe Expressionskontrollsequenz befindet sich in diesem Vektor proximal zum Translationsstart der kodierenden Sequenz.

[0103] Mit diesem Verfahren kann somit einfach und schnell festgestellt werden, welche Anordnung einer heterologen Expressionskontrollsequenz im Genom einer Wirtszelle gewählt werden muß, um eine optimale Expression eines endogenen Zielgens zu erreichen.

#### **Beispiel 3 Herstellung von DHFR-negativen Zellen**

[0104] In einem ersten Schritt werden erfindungsgemäße Vektoren für die Rekombination hergestellt. Diese Vektoren werden in einem zweiten Schritt in humane Zelllinien transfiziert und auf homologe Rekombinationsereignisse gescreent. Auf diese Weise kann erst ein, dann das 2. Allel für das DHFR-Gen inaktiviert werden.

#### **DHFR-Vektor für die homologe Rekombination**

[0105] Das humane DHFR-Gen ist auf Chromosom 5 lokalisiert und umfaßt 30 kb, die sich in 6 Exons gliedern. Ein

1,8 kb großes EcoRI-Fragment, welches Teile des Promotors, Teile von Exon 2 und das komplette Exon 1 enthält, wird zur Herstellung des Vektors für die homologe Rekombination verwendet. Exon 1 wird durch einen AapI-Verdau entfernt und in die entstandene Lücke (0,45 kb) wird das Neo-(1,4 kb)- bzw. Hyg-(2,2 kb)-Resistenzgen über Linker eingesetzt. Diese Linker enthalten zusätzlich zu den Adaptornukleotiden die minimale Sequenz TAT TG AAG CAT ATT ACA TAC GAT ATG CTT CAA TA (loxP-Sequenz). Die Linkersequenzen sind in der gleichen Orientierung, das Resistenzgen bevorzugt antisense zum DHFR-Gen angeordnet. Nachdem das Resistenzgen eingesetzt wurde, wird die Homologie-region vergrößert. Hierzu wird der Vektor um das EcoRI Fragmente aus dem 3'-Bereich (6,0 kb) erweitert (Fig. 6). Man erhält somit die erfindungsgemäßen Targetkonstrukte pNDI (11,5 kb) und pHDI (12,3 kb).

[0106] Nach erfolgreicher homologer Rekombination sind das komplette Exon 1 (Aminosäuren 1-28) und Teile des Promotors des DHFR-Gens entfernt. Die Zelle kann nun kein funktionelles DHFR-Protein mehr exprimieren.

#### Transfektion von Zellen

[0107] Die verwendeten humanen Zelllinien sollten nicht polyploid für Chromosom 5 sein und nicht unter MTX Selektion gehalten worden sein. In beiden Fällen würden mehr als 2 Allele zu inaktivieren sein.

#### HeLa S3-Zellen (ATCC CCL-2.2)

[0108] Die Zellen werden in Gewebekulturflaschen in RPMI 1640 Medium, 10% fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und 1 mM MEM (nichtessentielle Aminosäuren) kultiviert. Die Inkubation erfolgt bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Der Elektroporationspuffer enthält 20 mM Hepes, 138 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 mM D-Glucose-Monohydrat, pH 7,0. 10 µg linearisierte Vektor-DNA (pNDI) wird bei 960 µF und 250V in 1 x 10<sup>7</sup> Zellen elektroporiert (Biorad Gene Pulser). Nach der Elektroporation werden die Zellen in Medium mit 600 µg/ml G418 (Geneticin Boehringer Mannheim) aufgenommen und kultiviert. Nach 10 Tagen Selektion (Mediumwechsel alle 2 Tage) werden die positiven Klone isoliert und expandiert.

#### HT1080 Zellen (ATCC CCL-121)

[0109] Die Kultivierung und Selektion der Zellen erfolgt wie für HeLa S3-Zellen beschrieben mit DMEM-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat.

#### Namalwazellen (ATCC CRL-1432)

[0110] Diese Zelllinie ist eine Suspensionszelllinie und muß entsprechend kultiviert werden. Das Medium entspricht dem für HeLa S3-Zellen beschriebenen. Nach der Transfektion werden die Zellen auf vierzig 96well-Platten verteilt. Positive Klone werden in 48-, 24-, 12- und 6-well Platten expandiert. Die Selektion erfolgt mit 1 mg/ml G418.

#### Nachweis der DHFR-negativen (+/-) Zellen

[0111] Der Nachweis der Insertion des Vektors wird mittels Southern Blot Analyse oder PCR durchgeführt. Bei korrekt erfolgter homologer Rekombination wird nach EcoRI-Verdau zusätzlich zu einer 1,8 kb Bande, die das intakte DHFR-Gen repräsentiert, eine 2,9 kb Bande nachgewiesen, welche durch die Insertion des Neo-Gens entstanden ist (Figur 7c). Mischklone (ungleiches Verhältnis der Bandenintensität in Southern Blot) werden über Einzeltzellablage im FACS getrennt, subkloniert und anschließend expandiert. In den als positiv identifizierten Klonen ist ein Allel des DHFR-Gen inaktiviert.

#### Erzeugung von DHFR-negativen (-/-) Zellen

[0112] Zellklone, in denen ein DHFR-Allel (+/-) inaktiviert ist, können einer erneuten homologen Rekombination unterzogen werden. Hierzu werden sie wie oben beschrieben mit 10 µg linearisierter DNA des Vektors pHDI transfiziert. Die Selektion erfolgt in Medium mit 500 µg/ml Hygromycin B (Boehringer Mannheim).

[0113] Durch eine Erhöhung der G418-Konzentration im Medium kann der Selektionsdruck auf DHFR<sup>+/+</sup> Zellen erhöht werden und DHFR<sup>-/-</sup> Zellen erhalten werden. Eine genetische Konversion führt zu einer interchromosomalen Rekombination, wodurch das zweite DHFR-Allel inaktiviert wird.

[0114] Die DHFR<sup>-/-</sup> Zellen enthalten zwei inaktivierte DHFR-Allele und können kein Tetrahydrofolat mehr synthetisieren. Daher muß dem Medium Thymidin, Glycin und Purin zugegeben werden (Supplementation). Gegebenenfalls werden die Zellen in  $\alpha$  Medium (Gibco BRL) kultiviert.

[0115] Der Nachweis der DHFR<sup>-/-</sup> Zellen erfolgt wie oben beschrieben. Bei homozygoten DHFR-negativen Zellen ist

keine Wildtypbande (1,8 kb) nachweisbar. Zellen, die mit pHDI transfiziert wurden, zeigen nach homologer Rekombination eine neue 3,7 kb Bande in EcoRI Southern Blot (Figur 7c).

#### Verwendung von DHFR-negativen Zellen (-/-)

[0116] Die erfindungsgemäßen Zellen können zur Hochproduktion von Proteinen verwendet werden. Hierzu wird ein erfindungsgemäßer Vektor (gemäß Figur 8) und ein eine Cre-Rekombinase kodierender Expressionsvektor in die DHFR<sup>-/-</sup> Zellen transfiziert. Die Cre-Rekombinase entfernt die Antibiotikum-Resistenz aus dem DHFR-Genlocus und integriert in die loxP-Sequenz im Genom der DHFR<sup>-/-</sup> Zelle den erfindungsgemäßen Vektor. Die Zellen werden wieder antibiotikumsensitiv und unabhängig von einer Thymidin, Glycin und Purin Supplementation.

[0117] Die Selektion kann durch Verwendung eines Mediums ohne Supplementation oder durch Zugabe eines geeigneten Antibiotikums zum Kulturmedium erfolgen. Das Antibiotikum entspricht dabei dem Resistenzgen, das durch die Cre-Rekombinase aus dem Genom der Zelle entfernt wurde. Enthält der in die loxP-Sequenz integrierte Vektor ein positives Selektionsmarkergen, kann die Selektion durch Zugabe dieses Antibiotikums zum Medium durchgeführt werden.

#### Erhöhung der Produktionsleistung durch Genamplifikation

[0118] Um die Produktionsleistung der Zellen für das rekombinante Protein zu erhöhen, wird eine Methotrexat (MTX)-Selektion durchgeführt, wodurch das in die Zelle eingeführte DHFR-Gen und die heterologe für ein Protein kodierende Nukleinsäuresequenz amplifiziert werden.

[0119] Um eine Amplifikation zu erreichen, werden die Zellen in Gegenwart von steigenden Konzentrationen (100-1000 mM) MTX kultiviert. Der Grad der Amplifikation erfolgt über densitometrische Auswertung von vergleichenden Southern Blots (vor, während, nach MTX-Zugabe).

[0120] Die nach dem Amplifikationsschritt erhaltenen erfindungsgemäßen Zellen enthalten an dem loxP-Locus viele Kopien des eingeführten DHFR-Gens und der eingeführten heterologen Nukleinsäuresequenz. Sie zeichnen sich durch eine hohe Produktionsleistung der heterologen Nukleinsäure aus.

[0121] Im Folgenden sind bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung als Bestandteil der Beschreibung dargestellt:

1. Verfahren zum Verändern der Expression einer in einer eukaryontischen Zelle endogen vorliegenden Nukleinsäuresequenz, dadurch gekennzeichnet, daß

(a) die Zelle transfiziert wird mit einem ersten Vektor, umfassend

(i) mindestens eine Sequenz ausgewählt aus einer ersten heterologen Expressionskontrollsequenz und einem ersten Amplifikationsgen,

(ii) ein positives Selektionsmarkergen,

(iii) mindestens jeweils zwei die Sequenz (i) und (ii) flankierende Zielsequenzen für eine ortsspezifische Rekombinase,

(iv) die Sequenzen (i), (ii) und (iii) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einem Nukleinsäureabschnitt im Genom der Zelle sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben,

(b) die transfizierte Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen eine homologe Rekombination des Vektors erfolgt, und

(c) die gemäß Schritt (b) erhaltene Zelle gewonnen wird.

2. Verfahren nach Punkt 1,

dadurch gekennzeichnet,

daß man als Rekombinase-Zielsequenzen loxP-Sequenzen verwendet.

3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Zelle eine humane Zelle ist.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Zelle eine immortalisierte Zelle ist.

5. Verfahren nach Punkt 4,  
dadurch gekennzeichnet,

daß die Zelle eine HT1080-, Namalwa- oder HeLa S3 Zelle ist.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte,

dadurch gekennzeichnet,

daß die heterologe Expressionskontrollsequenz einen Promotor/Enhancer, vorzugsweise einen viralen Promotor, besonders bevorzugt einen CMV-Promotor umfaßt.

7. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 6,

dadurch gekennzeichnet,

daß die heterologe Expressionskontrollsequenz eine 3'-nichtkodierende Sequenz umfaßt.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte,

dadurch gekennzeichnet,

daß die homologen Sequenzen so ausgewählt werden, daß durch die homologe Rekombination eine endogene Expressionskontrollsequenz der endogen vorliegenden Nukleinsäuresequenz entfernt wird.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte,

dadurch gekennzeichnet,

daß das positive Selektionsmarkergen ein Neomycin-, Kanamycin-, Geneticin- oder Hygromycin-Resistenzgen ist.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte,

dadurch gekennzeichnet,

daß der Vektor weiterhin ein negatives Selektionsmarkergen umfaßt, welches außerhalb der homologen Sequenzen gemäß Anspruch 1(a) (iv) angeordnet ist.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte,

dadurch gekennzeichnet,

daß die zwischen den Rekombinase-Zielsequenzen lokalisierte Nukleinsäuresequenz durch transiente Aktivierung einer die Zielsequenzen erkennenden ortsspezifischen Rekombinase aus dem Genom der Zelle herausgeschnitten wird.

12. Verfahren nach Punkt 11,

dadurch gekennzeichnet,

daß

(a) die Zelle transfiziert wird mit einem weiteren Vektor, umfassend

(i) mindestens eine Sequenz ausgewählt aus einer zweiten heterologen Expressionskontrollsequenz und einem zweiten Amplifikationsgen,

(ii) ein positives Selektionsmarkergen, das sich vorzugsweise von dem positiven Selektionsmarkergen des ersten Vektors unterscheidet und

(iii) mindestens zwei die Sequenzen (i) und (ii) flankierende Rekombinase-Zielsequenzen,

(b) die transfizierte Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen eine Integration der von den Zielsequenzen flankierten Sequenz an der Zielsequenz im Genom der Zelle erfolgt,

(c) die gemäß Schritt (b) erhaltene Zelle gewonnen wird und

(d) gegebenenfalls die Schritte (a) bis (c) mindestens einmal mit jeweils variierenden Expressionskontrollsequenzen oder/und Amplifikationsgenen wiederholt werden.

13. Vektor für die homologe Rekombination, umfassend

(i) mindestens eine Sequenz ausgewählt aus einer Expressionskontrollsequenz und einem Amplifikationsgen,

(ii) ein positives Selektionsmarkergen,

(iii) mindestens zwei Sequenzen (i) und (ii) flankierende Zielsequenzen für eine ortsspezifische Rekombinase,



- (iv) die Sequenzen (i), (ii) und (iii) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einem Nukleinsäureabschnitt im Genom einer Zelle sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben, und  
(v) gegebenenfalls ein negatives Selektionsmarkergen.

5 14. Vektor, umfassend

- (i) mindestens eine Sequenz ausgewählt aus einer heterologen Expressionskontrollsequenz und einem Amplifikationsgen,  
(ii) ein positives Selektionsmarkergen,  
10 (iii) mindestens zwei die Sequenzen (i) und (ii) flankierende Rekombinase-Zielsequenzen, und  
(iv) gegebenenfalls ein negatives Selektionsmarkergen.

15 15. Eukaryontische Zelle, vorzugsweise humane Zelle, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 12.

16. Eukaryontische Zelle, vorzugsweise humane Zelle,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie

- 20 (a) mindestens eine chromosomal lokalisierte Sequenz ausgewählt aus einer heterologen Expressionskontrollsequenz und einem Amplifikationsgen in operativer Verknüpfung mit einer endogen vorliegenden Nukleinsäuresequenz enthält und wobei  
(b) diese Sequenz flankiert ist von Rekombinase-Zielsequenzen.

25 17. Verfahren zum Verändern der Expression einer in einer eukaryontischen Zelle endogen vorliegenden Nukleinsäuresequenz,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß

30 (a) die Zelle transfiziert wird mit einem Vektor, umfassend

- (i) mindestens eine Aktivatorprotein bindende Nukleinsäuresequenz,  
(ii) ein positives Selektionsmarkergen,  
35 (iii) die Sequenzen (i) und (ii) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einem Nukleinsäureabschnitt im Genom der Zelle sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben,

- (b) die transfizierte Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen eine homologe Rekombination des Vektors erfolgt, und  
40 (c) die gemäß Schritt (b) erhaltene Zelle gewonnen wird.

18. Verfahren nach Punkt 17,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß mindestens eine Hypoxia-Inducible-Faktor (HIF)-bindende Nukleinsäuresequenz verwendet wird.

45 19. Verfahren nach Punkt 18,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die HIF-bindende Nukleinsäuresequenz ausgewählt wird aus der 53 bp Sequenz gemäß Sequenz ID NO. 1, der 43 bp Sequenz gemäß Sequenz ID NO. 2, einer zu diesen Sequenzen homologen Sequenz oder einer mit diesen Sequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisierenden Sequenz.

50 20. Verfahren nach einem der Punkte 17 bis 19 weiterhin umfassend Transfizieren der Zelle mit einem Vektor, umfassend

- 55 (i) eine für ein Aktivatorprotein kodierende Nukleinsäuresequenz, die operativ verbunden ist mit einer in dieser Zelle aktiven Expressionskontrollsequenz und  
(ii) gegebenenfalls ein positives Selektionsmarkergen.

21. Verfahren nach Punkt 20,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß das Aktivatorprotein ein HIF-1 $\alpha$ - oder/und HIF-1 $\beta$ -Protein ist.

22. Verfahren nach einem der Punkte 18 bis 21,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Zellen bei einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 0,1 bis 2 % kultiviert werden.

23. Vektor für die homologe Rekombination, umfassend

- (i) mindestens eine ein Aktivatorprotein bindende Nukleinsäuresequenz,
- (ii) ein positives Selektionsmarkergen,
- (iii) die Sequenzen (i) und (ii) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einem Nukleinsäureabschnitt im Genom einer Zelle sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben.

24. Eukaryontische Zelle, vorzugsweise humane Zelle, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Punkte 17 bis 21.

25. Eukaryontische Zelle, vorzugsweise humane Zelle,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie mindestens ein heterologes, chromosomal lokalisiertes, ein Aktivatorprotein/-komplex bindendes Nukleinsäurefragment operativ verknüpft mit einem endogen in der Zelle vorliegenden Gen enthält.

26. Verfahren zum Testen des Einflusses von nichtkodierenden Nukleinsäuresequenzen aus dem Bereich eines in einer eukaryontischen Zelle endogen vorliegenden Zielgens auf dessen Expression, das dadurch gekennzeichnet ist, daß

(a) die Zelle transfiziert wird mit einem Vektor, umfassend

- (i) eine heterologe in der Zelle aktive oder aktivierbare Expressionskontrollsequenz operativ verknüpft mit einem Reportergen, und
- (ii) 5'-seitig oder/und 3'-seitig nichtkodierende Nukleinsäurefragmente aus dem Bereich des Zielgens,

(b) die Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen die Expressionskontrollsequenz aktiv ist, und  
(c) die Expression des Reportergens gemessen wird.

27. Verfahren nach Punkt 26,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß das Reportergen für Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT),  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) oder LacZ kodiert.

28. Verfahren nach einem der Punkte 26 oder 27,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß

- (a) mindestens 2 Vektoren, die voneinander verschiedene 5'-seitige oder/und 3'-seitige nichtkodierende Nukleinsäurefragmente des Zielgens enthalten, in jeweils unterschiedliche Zellen transfiziert werden und
- (b) die Expression des Reportergens in den unterschiedlichen Zellen bestimmt wird.

29. Verfahren zur Bereitstellung einer DHFR-negativen eukaryontischen Zelle,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß

(a) die Zelle transfiziert wird mit einem ersten Vektor, umfassend

- (i) mindestens eine Zielsequenz für eine ortsspezifische Rekombinase,
- (ii) die Sequenz (i) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einer endogen in der Zelle vorliegenden DHFR-Nukleinsäuresequenz sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben, und
- (iii) gegebenenfalls ein positives und gegebenenfalls ein negatives Selektionsmarkergen,

(b) die transfizierte Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen eine homologe Rekombination des Vektors erfolgt, und

(c) die gemäß Schritt (b) erhaltene Zelle gewonnen wird.

5 30. Verfahren nach Punkt 29,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man als Rekombinase-Zielsequenzen loxP-Sequenzen verwendet.

31. Verfahren nach einem der Punkte 29 oder 30,  
10 dadurch gekennzeichnet,  
daß die für das positive Selektionsmarkergen kodierende Nukleinsäuresequenz ein Neomycin-, Kanamycin-,  
Geneticin- oder Hygromycin-Resistenzgen ist.

32. Verfahren nach einem der Punkte 29 bis 31,  
15 dadurch gekennzeichnet,  
daß die für das negative Selektionsmarkergen kodierende Nukleinsäuresequenz ein Thymidin-Kinase-Gen (TK)  
oder/und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen (HGPRT) ist.

33. Verfahren nach einem der Punkte 29 bis 32,  
20 dadurch gekennzeichnet,  
daß die von den Rekombinase-Zielsequenzen flankierte Sequenz aus dem Genom der Zelle durch eine transiente  
Aktivierung der entsprechenden Rekombinase herausgeschnitten wird.

34. Verfahren zum Einführen eines heterologen DHFR-Gens in eine eukaryontische Zelle,  
25 dadurch gekennzeichnet,  
daß eine durch das Verfahren nach Punkt 33 erhaltene Zelle

(a) transfiziert wird mit einem dritten Vektor, umfassend

30 (i) gegebenenfalls ein positives Selektionsmarkergen, das sich vorzugsweise von dem positiven Selekti-  
onsmarkergen des ersten Vektors unterscheidet,  
(ii) eine für eine DHFR kodierende Nukleinsäuresequenz,  
(iii) eine zu amplifizierende für ein Protein kodierende Nukleinsäuresequenz und  
wobei die Nukleinsäuresequenz aus den Teilsequenzen (i), (ii) und (iii) 5'-seitig und 3'-seitig jeweils von  
35 mindestens einer Rekombinase-Zielsequenz flankiert ist,

(b) die transfizierte Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen eine Integration der von Rekombinase-  
Zielsequenzen flankierten Nukleinsäuresequenz an der bereits im Genom der Zelle befindlichen Rekombin-  
ase-Zielsequenz erfolgt und

40 (c) die gemäß Schritt (b) erhaltene Zelle gewonnen wird.

35. Vektor, umfassend

45 (i) gegebenenfalls ein positives Selektionsmarkergen,  
(ii) eine für eine DHFR kodierende Nukleinsäuresequenz und  
(iii) eine für ein gewünschtes Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in exprimierbarer Form,

wobei die Nukleinsäuresequenz aus den Teilsequenzen (i), (ii) und (iii) 5'-seitig und 3'-seitig jeweils von mindestens  
einer Rekombinase-Zielsequenz flankiert ist.

50

36. Vektor für die homologe Rekombination, umfassend

(i) gegebenenfalls ein positives Selektionsmarkergen,  
(ii) mindestens jeweils eine Rekombinase-Zielsequenz, die die Sequenz (i) flankiert,  
55 (iii) die Sequenzen (i) und (ii) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einer endogen in einer Zelle vor-  
liegenden DHFR-Nukleinsäuresequenz sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben und  
(iv) gegebenenfalls ein negatives Selektionsmarkergen außerhalb der homologen Sequenzen (iii).

37. Eukaryontische Zelle, vorzugsweise humane Zelle, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Punkte 29 bis 34.

38. Eukaryontische Zelle, vorzugsweise humane Zelle,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß

- (a) mindestens eine endogene, für eine DHFR kodierende Nukleinsäuresequenz inaktiviert ist und
- (b) im Bereich dieser für DHFR kodierenden Nukleinsäuresequenz mindestens eine Rekombinase-Zielsequenz in das Genom integriert ist.

39. Eukaryontische Zelle, vorzugsweise humane Zelle,  
gekennzeichnet durch  
eine heterologe Nukleinsäuresequenz im Bereich eines endogenen DHFR-Genlocus, umfassend

- (i) eine für eine DHFR kodierende Nukleinsäuresequenz,
- (ii) eine für ein gewünschtes Protein kodierende Nukleinsäuresequenz und
- (iii) mindestens eine Rekombinase-Zielsequenz.

SEQUENZPROTOKOLL

5

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
- (B) STRASSE: Sandhofer Strasse 112-132
- (C) ORT: Mannheim
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-68305

10

- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Optimierung von Zellen fuer die endogene Genaktivierung

15

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 3

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 53 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CCTCTCCTCT AGGCCCGTGG GGCTGGCCCT GCACCGCCGA GCTTCCCGGG ATG

53

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

40

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CTACGTGCTG TCTCACACAG CCTGTCTGAC CTCTCGACCC TAC

43

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

55

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 34 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: beides  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

TATTGAAGCA TATTACATAC GATATGCTTC AATA

# Patentansprüche

1. Verfahren zum Verändern der Expression einer in einer eukaryontischen Zelle endogen vorliegenden Nukleinsäuresequenz,  
 dadurch gekennzeichnet,  
 daß

(a) die Zelle transfiziert wird mit einem Vektor, umfassend

- (i) mindestens eine Aktivatorprotein bindende Nukleinsäuresequenz,
- (ii) ein positives Selektionsmarkergen,
- (iii) die Sequenzen (i) und (ii) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einem Nukleinsäureabschnitt im Genom der Zelle sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben,

(b) die transfizierte Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen eine homologe Rekombination des Vektors erfolgt, und

(c) die gemäß Schritt (b) erhaltene Zelle gewonnen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1,  
 dadurch gekennzeichnet,  
 daß mindestens eine Hypoxia-Inducible-Faktor (HIF)-bindende Nukleinsäuresequenz verwendet wird.

3. Vektor für die homologe Rekombination, umfassend

- (i) mindestens eine ein Aktivatorprotein bindende Nukleinsäuresequenz,
- (ii) ein positives Selektionsmarkergen,
- (iii) die Sequenzen (i) und (ii) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einem Nukleinsäureabschnitt im Genom einer Zelle sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben.

4. Eukaryontische Zelle, vorzugsweise humane Zelle, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3.

5. Eukaryontische Zelle, vorzugsweise humane Zelle,  
 dadurch gekennzeichnet,  
 daß sie mindestens ein heterologes, chromosomal lokalisiertes, ein Aktivatorprotein/-komplex bindendes Nukleinsäurefragment operativ verknüpft mit einem endogen in der Zelle vorliegenden Gen enthält.

6. Verfahren zum Testen des Einflusses von nichtkodierenden Nukleinsäuresequenzen aus dem Bereich eines in einer eukaryontischen Zelle endogen vorliegenden Zielgens auf dessen Expression, das dadurch gekennzeichnet ist, daß

(a) die Zelle transfiziert wird mit einem Vektor, umfassend

(i) eine heterologe in der Zelle aktive oder aktivierbare Expressionskontrollsequenz operativ verknüpft mit einem Reportergen, und

(ii) 5'-seitig oder/und 3'-seitig nichtkodierende Nukleinsäurefragmente aus dem Bereich des Zielgens,

(b) die Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen die Expressionskontrollsequenz aktiv ist, und

(c) die Expression des Reportergens gemessen wird.

7. Verfahren zur Bereitstellung einer DHFR-negativen eukaryontischen Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß

(a) die Zelle transfiziert wird mit einem ersten Vektor, umfassend

(i) mindestens eine Zielsequenz für eine ortsspezifische Rekombinase,

(ii) die Sequenz (i) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einer endogen in der Zelle vorliegenden DHFR-Nukleinsäuresequenz sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben, und

(iii) gegebenenfalls ein positives und gegebenenfalls ein negatives Selektionsmarkergen,

(b) die transfizierte Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen eine homologe Rekombination des Vektors erfolgt, und

(c) die gemäß Schritt (b) erhaltene Zelle gewonnen wird.

8. Verfahren zum Einführen eines heterologen DHFR-Gens in eine eukaryontische Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß eine durch das Verfahren nach Anspruch 7 erhaltene Zelle

(a) transfiziert wird mit einem dritten Vektor, umfassend

(i) gegebenenfalls ein positives Selektionsmarkergen, das sich vorzugsweise von dem positiven Selektionsmarkergen des ersten Vektors unterscheidet,

(ii) eine für eine DHFR kodierende Nukleinsäuresequenz,

(iii) eine zu amplifizierende für ein Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in exprimierbarer Form und wobei die Nukleinsäuresequenz aus den Teilsequenzen (i), (ii) und (iii) 5'-seitig und 3'-seitig jeweils von mindestens einer Rekombinase-Zielsequenz flankiert ist,

(b) die transfizierte Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen eine Integration der von Rekombinase-Zielsequenzen flankierten Nukleinsäuresequenz an der bereits im Genom der Zelle befindlichen Rekombinase-Zielsequenz erfolgt und

(c) die gemäß Schritt (b) erhaltene Zelle gewonnen wird.

9. Vektor, umfassend

(i) gegebenenfalls ein positives Selektionsmarkergen,

(ii) eine für eine DHFR kodierende Nukleinsäuresequenz und

(iii) eine für ein gewünschtes Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in exprimierbarer Form,

wobei die Nukleinsäuresequenz aus den Teilsequenzen (i), (ii) und (iii) 5'-seitig und 3'-seitig jeweils von mindestens einer Rekombinase-Zielsequenz flankiert ist.

10. Vektor für die homologe Rekombination, umfassend

(i) gegebenenfalls ein positives Selektionsmarkergen,

(ii) mindestens jeweils eine Rekombinase-Zielsequenz, die die Sequenz (i) flankiert,

(iii) die Sequenzen (i) und (ii) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einer endogen in einer Zelle vorliegenden DHFR-Nukleinsäuresequenz sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben und

(iv) gegebenenfalls ein negatives Selektionsmarkergen außerhalb der homologen Sequenzen (iii).

11. Eukaryontische Zelle, vorzugsweise humane Zelle,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß

- 5           (a) mindestens eine endogene, für eine DHFR kodierende Nukleinsäuresequenz inaktiviert ist und  
          (b) im Bereich dieser für DHFR kodierenden Nukleinsäuresequenz mindestens eine Rekombinase-Zielse-  
          quenz in das Genom integriert ist.

12. Eukaryontische Zelle, vorzugsweise humane Zelle,  
gekennzeichnet durch

10           eine heterologe Nukleinsäuresequenz im Bereich eines endogenen DHFR-Genlocus, umfassend

- (i) eine für eine DHFR kodierende Nukleinsäuresequenz,  
          (ii) eine für ein gewünschtes Protein kodierende Nukleinsäuresequenz und  
15           (iii) mindestens eine Rekombinase-Zielsequenz.

20

25

30

35

40

45

50

55



Fig. 1

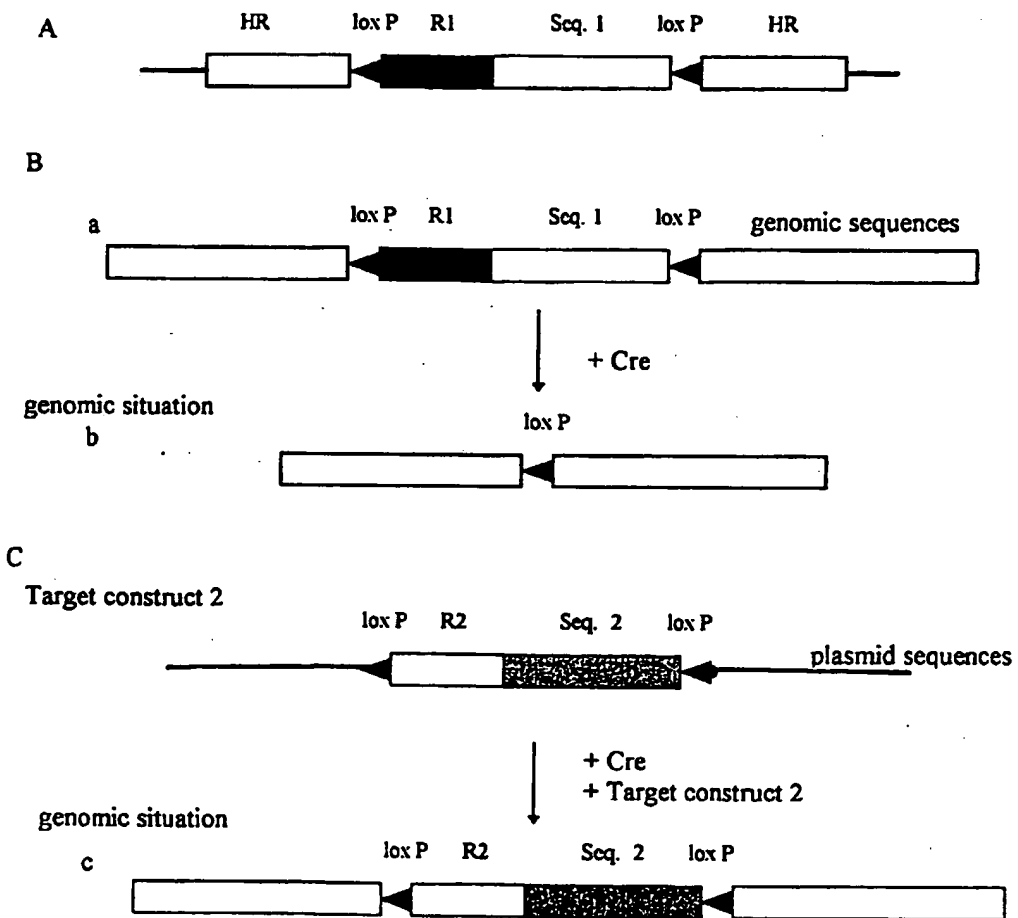
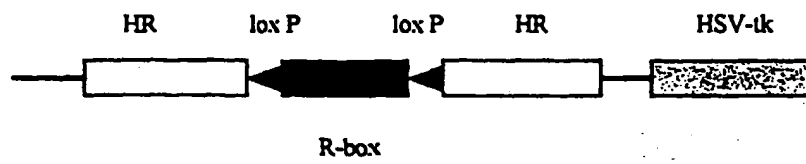


Fig. 2:

A.



B.

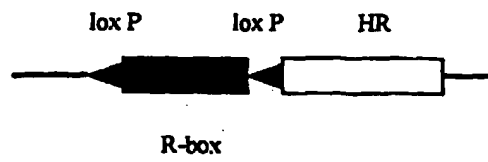
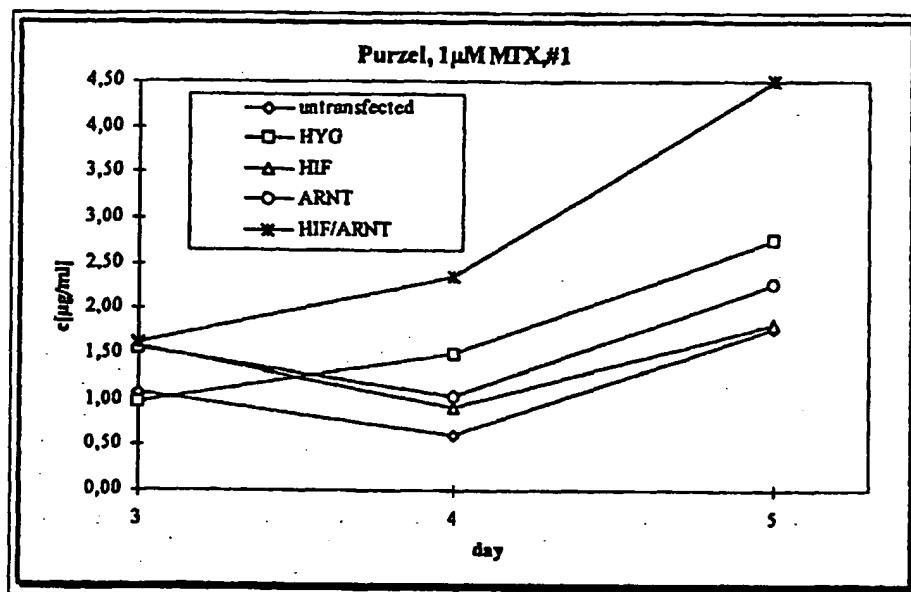


Fig. 3



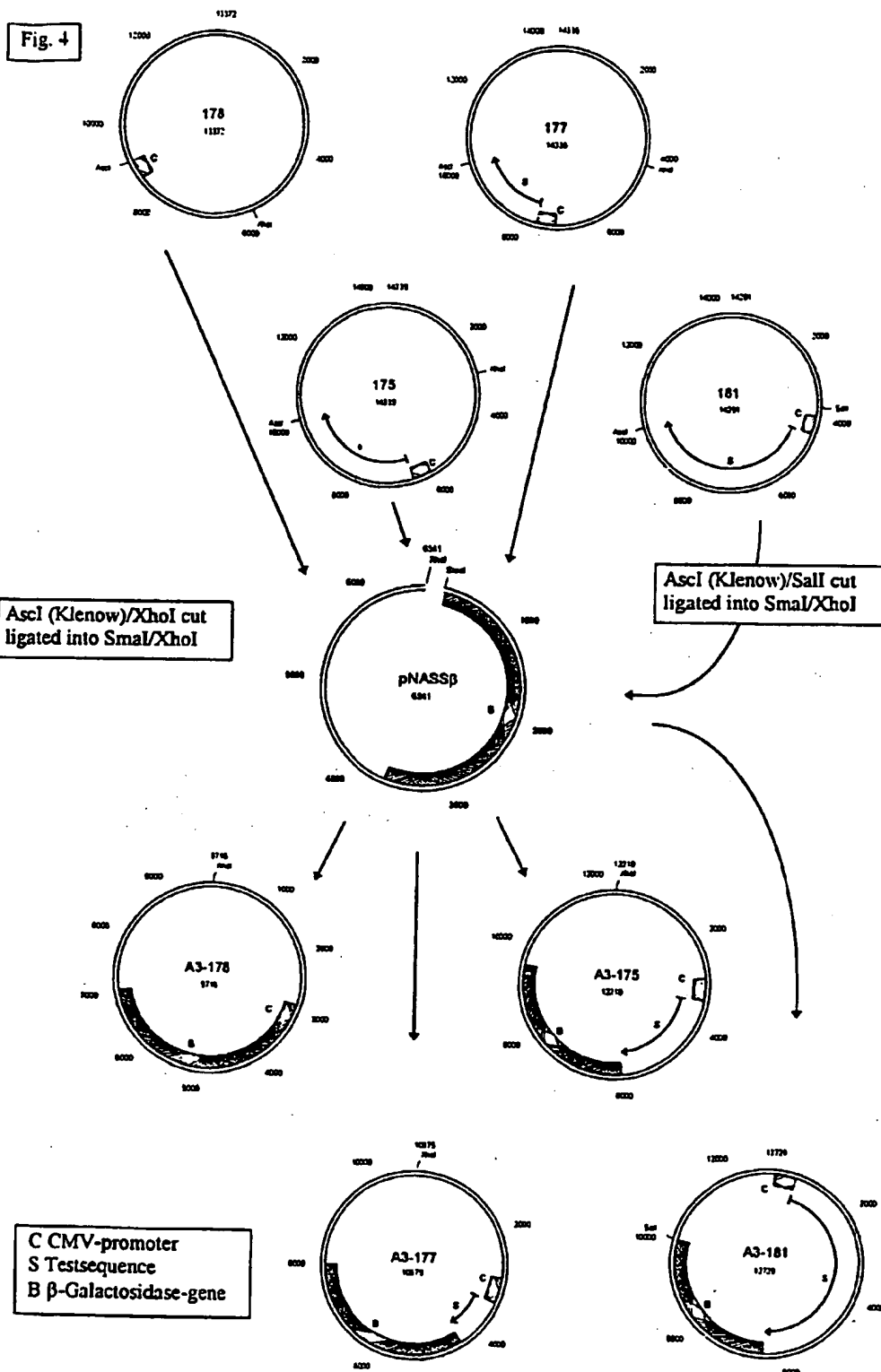


Fig. 5:

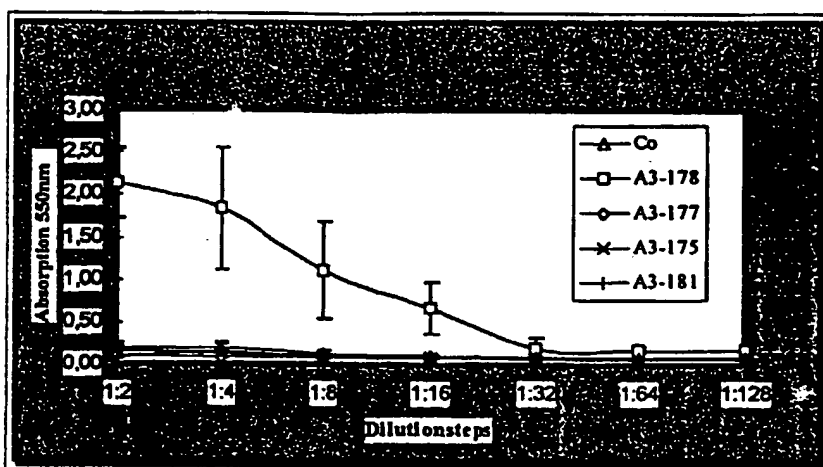
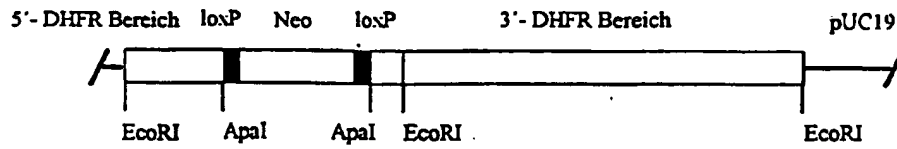


Fig. 6

A. pNDI (11.5kb)



B. pHDI (12.3kb)

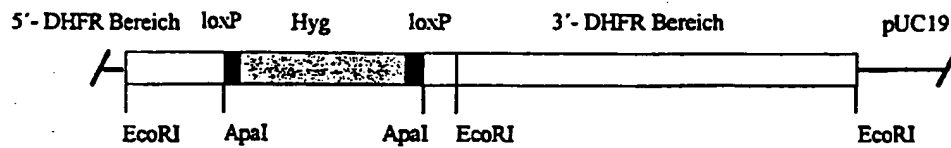
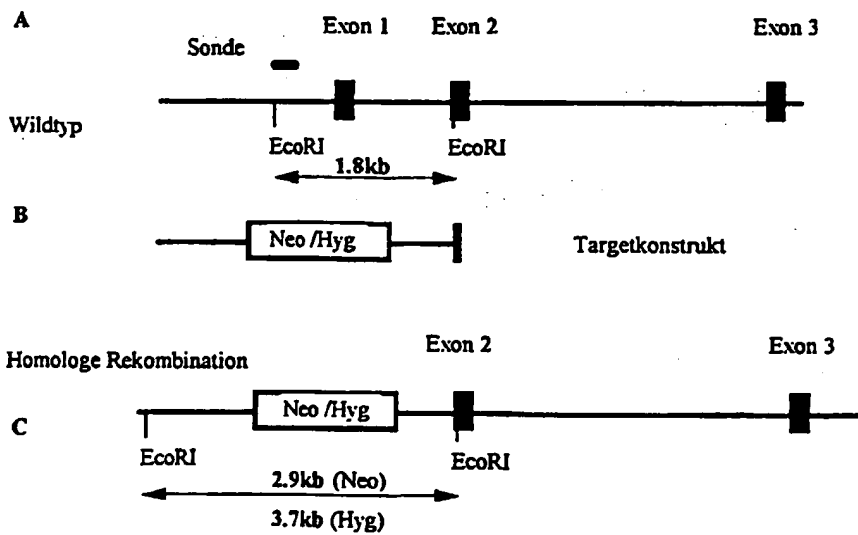
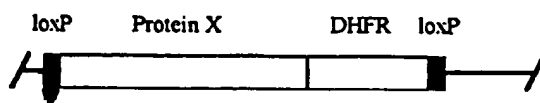


Fig. 7



Neo, Neomycin; Hyg, Hygromycin; kb, Kilobasen

Fig. 8





Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) **EP 0 957 165 A3**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(88) Veröffentlichungstag A3:  
**04.10.2000 Patentblatt 2000/40**

(43) Veröffentlichungstag A2:  
**17.11.1999 Patentblatt 1999/46**

(21) Anmeldenummer: **99112607.9**

(22) Anmeldetag: **01.12.1998**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **C12N 15/12, C12N 15/65,  
C12N 15/67, C12N 15/85,  
C12N 15/90, C12N 5/10,  
C07K 14/505, C12Q 1/68**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE**  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
**AL LT LV MK RO SI**

(30) Priorität: **01.12.1997 EP 97121075**

(62) Dokumentnummer(n) der früheren Anmeldung(en)  
nach Art. 76 EPÜ:  
**98122807.5 / 0 919 619**

(71) Anmelder: **Roche Diagnostics GmbH  
68305 Mannheim (DE)**

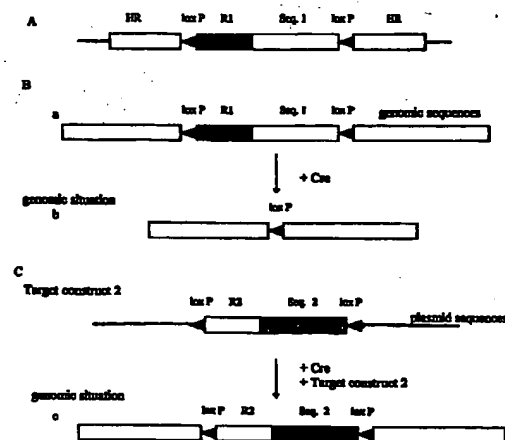
(72) Erfinder:  
• **Honold, Konrad  
82377 Penzberg (DE)**  
• **Holtshke, Thomas  
81369 München (DE)**  
• **Stern, Anne  
82377 Penzberg (DE)**

(74) Vertreter:  
**Weiss, Wolfgang, Dipl.-Chem. Dr. et al  
Patentanwälte  
Weickmann & Partner,  
Postfach 86 08 20  
81635 München (DE)**

(54) **Optimierung von Zellen für die endogene Genaktivierung**

(57) Die Erfindung betrifft Verfahren zur Optimierung der Genexpression in Zellen. Ein erster Aspekt betrifft ein Verfahren zum Verändern der Expression eines in einer eukaryontischen Zelle endogen vorliegenden Zielgens durch Einführen einer heterologen Expressionskontrollsequenz in das Genom der Zelle mittels homologer Rekombination, sowie das durch eine ortsspezifische Rekombinase vermittelte Herausschneiden der inserierten Fremd-DNA und ihr Ersetzen durch weitere heterologe Expressionskontrollsequenzen oder/und Amplifikationsgene. Weiterhin betrifft die Erfindung das Einführen einer oder mehrerer Nukleinsäuresequenzen, an die ein Aktivatorprotein oder ein Aktivatorproteinkomplex, z.B. ein Hypoxia-Inducible-Factor (HIF) bindet, in das Genom einer eukaryontischen Zelle durch homologe Rekombination, um die Expression eines Zielgens zu verändern. Desweiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Testen des Einflusses 5'-seitig oder 3'-seitig nicht kodierender Nukleinsäurefragmente auf die Expression eines Zielgens durch Bestimmen der Expression eines Reportergens. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Bereitstellung einer eukaryontischen Zelle, die eine Rekombinase-Zielsequenz enthaltende DHFR-negative eukaryontische Zelle sowie die Expression einer in der Rekombinase-Zielsequenz inserierten Nukleinsäuresequenz.

Fig. 1



EP 0 957 165 A3



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 99 11 2607

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	SEMENZA G L ET AL: "A NUCLEAR FACTOR INDUCED BY HYPOXIA VIA DE NOVO PROTEIN SYNTHESIS BINDS TO THE HUMAN ERYTHROPOIETIN GENE ENHANCER AT A SITE REQUIRED FOR TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Bd. 12, Nr. 12, 1. Dezember 1992 (1992-12-01), Seiten 5447-5454, XP000562137 ISSN: 0270-7306 * das ganze Dokument *	6	C12N15/12 C12N15/65 C12N15/67 C12N15/85 C12N15/90 C12N5/10 C07K14/505 C12Q1/68
X	DAMERT A ET AL: "Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-induciblefactor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells" BIOCHEMICAL JOURNAL, Bd. 327, Nr. PART 02, 15. Oktober 1997 (1997-10-15), Seiten 419-423, XP002083936 ISSN: 0264-6021 * das ganze Dokument *	6	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
X	TIAN ET AL: "Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells" GENES AND DEVELOPMENT, Bd. 11, Nr. 1, 1. Januar 1997 (1997-01-01), Seiten 72-82, XP002100643 ISSN: 0890-9369 * das ganze Dokument *	6	C12N C07K C12Q
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
DEN HAAG	11. August 2000	Hornig, H	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument &: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: mündliche Offenbarung P: Zwischenliteratur			

EPO FORM 1503 03 82 (P04C03)





Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 99 11 2607

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cls)
X	SEMENZA G L ET AL: "TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF GENES ENCODING GLYCOLYTIC ENZYMES BY HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 269, Nr. 38, 23. September 1994 (1994-09-23), Seiten 23757-23763, XP000578184 ISSN: 0021-9258 * das ganze Dokument *	6	
Y	WO 96 39426 A (UNIV JOHNS HOPKINS MED) 12. Dezember 1996 (1996-12-12) * Ansprüche 10,20-26 *	1-5	
A	* Ansprüche 10,20-26 *	6-12	
D,Y	WO 90 11354 A (PASTEUR INSTITUT) 4. Oktober 1990 (1990-10-04) * das ganze Dokument *	1-5	
A	WO 96 29411 A (HEARTLEIN MICHAEL W ;TRANSKARYOTIC THERAPIES INC (US); HAUGE BRIAN) 26. September 1996 (1996-09-26) * das ganze Dokument *	1-12	
A	EP 0 747 485 A (CELL GENESYS INC) 11. Dezember 1996 (1996-12-11) * das ganze Dokument *	1-12	
D,A	WO 91 09955 A (APPLIED RESEARCH SYSTEMS ;CHAPPEL SCOTT C (US)) 11. Juli 1991 (1991-07-11) * das ganze Dokument *	1-12	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cls)
Recherchenort <b>DEN HAAG</b>		Abschlußdatum der Recherche <b>11. August 2000</b>	Prüfer <b>Hornig, H</b>
<p><b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</b></p> <p>X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur</p> <p>T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument &amp;: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

EPO FORM 1503 03.82 (P04C03)



Europäisches  
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 99 11 2607

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.8)
A	WANG G L ET AL: "GENERAL INVOLVEMENT OF HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1 IN TRANSCRIPTIONAL RESPONSE TO HYPOXIA" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 90, Nr. 9, 1. Mai 1993 (1993-05-01), Seiten 4304-4308, XP000561804 ISSN: 0027-8424 * das ganze Dokument *	1-12	
A	G U DACHS ET AL: "Targeting gene expression to hypoxic tumor cells" NATURE MEDICINE, Bd. 3, Nr. 5, 1. Mai 1997 (1997-05-01), Seiten 515-520, XP002096343 ISSN: 1078-8956 * das ganze Dokument *	1-12	
A	EP 0 343 783 A (BIOGEN INC) 29. November 1989 (1989-11-29) * das ganze Dokument *	7-12	
D, A	DATABASE WPI Section Ch, Week 198801 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1988-003020 XP002118545 & JP 62 265992 A (AJINOMOTO KK), 18. November 1987 (1987-11-18) * Zusammenfassung *	7-12	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.8)
Recherchenort <b>DEN HAAG</b>		Abschlußdatum der Recherche <b>11. August 2000</b>	Prüfer <b>Hornig, H</b>
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument Δ : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1603 03/82 (P04/2003)



Europäisches  
Patentamt

Nummer der Anmeldung

EP 99 11 2607

### GEBÜHRENPFLICHTIGE PATENTANSPRÜCHE

Die vorliegende europäische Patentanmeldung enthielt bei ihrer Einreichung mehr als zehn Patentansprüche.

- ☐ Nur ein Teil der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn sowie für jene Patentansprüche erstellt, für die Anspruchsgebühren entrichtet wurden, nämlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn Patentansprüche erstellt.

### MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung und enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

Siehe Ergänzungsblatt 8

- ☒ Alle weiteren Recherchengebühren wurden innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Recherchenabteilung nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
- ☐ Nur ein Teil der weiteren Recherchengebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf Erfindungen beziehen, für die Recherchengebühren entrichtet worden sind, nämlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der weiteren Recherchengebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf die zuerst in den Patentansprüchen erwähnte Erfindung beziehen, nämlich Patentansprüche:



Europäisches  
Patentamt

**MANGELNDE EINHEITLICHKEIT  
DER ERFINDUNG  
ERGÄNZUNGSBLATT B**

Nummer der Anmeldung  
EP 99 11 2607

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung und enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

**1. Ansprüche: 1-5**

Verfahren zur Veränderung der Expression einer eukaryotischen Zelle endogen vorliegender Nukleinsäuresequenz, dadurch gekennzeichnet, dass (a) die Zelle transfiziert wird mit einem Vektor, umfassend (i) mindestens eine Aktivatorprotein bindende Nukleinsäuresequenz, (ii) ein positives Selektionsmarkergen, (iii) die Sequenz (i) und (ii) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einem Nukleinsäureabschnitt im Genom der Zelle sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben, (b) die transfizierte Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen eine homologe Rekombination des Vektors erfolgt, und (c) die gemäss Schritt (b) erhaltene Zelle gewonnen wird; Besagtes Verfahren, dass mindestens eine Hypoxia-inducible-factor (HIF)-bindende Nukleinsäuresequenz verwendet wird; Vektor für diese homologe Rekombination, Eukaryotische Zelle, vorzugsweise humane Zelle, erhältlich durch ein oben beschriebenes Verfahren;

**2. Anspruch : 6**

Verfahren zum Testen des Einflusses von nichtkodierenden Nukleinsäuresequenzen aus dem Bereich eines in einer eukaryotischen Zelle endogen vorliegenden Zielgens auf dessen Expression, das dadurch gekennzeichnet ist, dass, (a) die Zelle transfiziert wird mit einem Vektor, umfassend (i) eine heterologe in der Zelle aktive oder aktivierbare Expressionskontrollsequenz operativ verknüpft mit einem Reportergen, und (ii) 5'-seitig oder/und 3'-seitig nichtkodierenden Nukleinsäurefragmente aus dem Bereich des Zielgens, (b) die Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen die Expressionskontrollsequenz aktiv ist, und (c) die Expression des Reportergens gemessen wird;

**3. Ansprüche: 7-12**

Verfahren zur Bereitstellung einer DHFR-negativen eukaryotischen Zelle, dadurch gekennzeichnet, dass (a) die Zelle transfiziert wird mit einem Vektor, umfassend (i) die Zielsequenz für eine ortsspezifische Rekombinase, (ii) die Sequenz (i) flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu einer in der Zelle vorliegenden DHFR-Nukleinsäuresequenz sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben, und (iii) gegenfalls ein positives und gegebenenfalls ein negatives Selektionsmarkergen, (b) die transfizierte Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen eine homologe Rekombination des Vektors erfolgt, und (c) die gemäss Schritt (b) erhaltene Zelle gewonnen wird; Verfahren zum



Europäisches  
Patentamt

**MANGELNDE EINHEITLICHKEIT  
DER ERFINDUNG  
ERGÄNZUNGSBLATT B**

Nummer der Anmeldung  
EP 99 11 2607

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung und enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

Einführen eines heterologen DHFR-Gens in eine eukaryotische Zelle, dadurch gekennzeichnet, dass oben erhaltene Zelle (a) transfiziert wird mit einem dritten Vektor, umfassend (i) gegebenenfalls ein positives Selektionsmarkergen, das sich vorzugsweise von dem positiven Selektionsmarkergen des ersten Vektors unterscheidet, (ii) eine für eine DHFR kodierende Nukleinsäuresequenz, (iii) eine zu amplifizierende für ein Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in exprimierbarer Form und wobei die Nukleinsäuresequenz aus den Teilsequenzen (i), (ii) und (iii) 5'-seitig und 3'-seitig jeweils von mindestens einer Rekombinase-Zielsequenz flankiert ist, (b) die transfizierte Zelle unter Bedingungen kultiviert wird, unter denen eine Integration der von Rekombinase-Zielsequenzen flankierten Nukleinsäuresequenz an der bereits im Genom der Zelle befindlichen Rekombinase-Zielsequenz erfolgt und (c) die gemäss Schritt (b) erhaltene Zelle gewonnen wird; Vektoren für dieses Verfahren und eukaryotische Zellen, vorzugsweise humane Zellen, die durch obiges Verfahren erhalten werden;

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 11 2607

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

11-08-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9639426 A	12-12-1996	US 5882914 A	16-03-1999
		AU 704384 B	22-04-1999
		AU 6332696 A	24-12-1996
		CA 2222279 A	12-12-1996
		EP 0833840 A	08-04-1998
		JP 11507541 T	06-07-1999
		US 6020462 A	01-02-2000
WO 9011354 A	04-10-1990	FR 2646438 A	02-11-1990
		AT 132189 T	15-01-1996
		DE 69024440 D	08-02-1996
		DE 69024440 T	08-08-1996
		DK 419621 T	29-01-1996
		EP 0419621 A	03-04-1991
		EP 0682111 A	15-11-1995
		EP 0682112 A	15-11-1995
		ES 2081977 T	16-03-1996
		HK 150696 A	16-08-1996
		JP 11318479 A	24-11-1999
		JP 3504335 T	26-09-1991
		SG 49110 A	18-05-1998
		SG 49112 A	18-05-1998
WO 9629411 A	26-09-1996	US 5733746 A	31-03-1998
		AU 5362596 A	08-10-1996
		CA 2215618 A	26-09-1996
		EP 0815232 A	07-01-1998
		JP 11502122 T	23-02-1999
		ZA 9602116 A	03-10-1996
EP 0747485 A	11-12-1996	GR 3029328 T	28-05-1999
		AT 139574 T	15-07-1996
		AT 174058 T	15-12-1998
		AU 635844 B	01-04-1993
		AU 7740791 A	31-05-1991
		CA 2045175 A	07-05-1991
		DE 69027526 D	25-07-1996
		DE 69027526 T	05-12-1996
		DE 69032809 D	14-01-1999
		DE 69032809 T	08-07-1999
		DK 452484 T	14-10-1996
		EP 0452484 A	23-10-1991
		EP 0945515 A	29-09-1999
		ES 2090297 T	16-10-1996
		ES 2127458 T	16-04-1999
		GR 3021105 T	31-12-1996

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 11 2607

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.  
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

11-08-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0747485 A		JP 4505104 T	10-09-1992
		NO 912642 A	05-09-1991
		WO 9106666 A	16-05-1991
		WO 9106667 A	16-05-1991
		US 5578461 A	26-11-1996
		US 6015708 A	18-01-2000
		US 5981214 A	09-11-1999
WO 9109955 A	11-07-1991	AT 156189 T	15-08-1997
		AU 645294 B	13-01-1994
		AU 7183691 A	24-07-1991
		BG 60624 B	31-10-1995
		BR 9007937 A	17-11-1992
		CA 2071989 A	23-06-1991
		DE 69031172 D	04-09-1997
		DE 69031172 T	12-03-1998
		DK 505500 T	25-08-1997
		EP 0505500 A	30-09-1992
		EP 0779362 A	18-06-1997
		ES 2104690 T	16-10-1997
		FI 922863 A	18-06-1992
		GR 3025057 T	30-01-1998
		HK 1000547 A	03-04-1998
		HU 62657 A	28-05-1993
		HU 217212 B	28-12-1999
		JP 5504682 T	22-07-1993
		KR 176693 B	01-04-1999
		LT 1595 A, B	25-07-1995
		LV 10655 A	20-04-1995
		LV 10655 B	20-08-1995
		NO 922436 A	19-06-1992
		QA 9594 A	30-04-1993
		RO 109864 A	30-06-1995
		RU 2128227 C	27-03-1999
		US 5272071 A	21-12-1993
		ZA 9010392 A	29-01-1992
EP 0343783 A	29-11-1989	US 4956288 A	11-09-1990
		AT 140960 T	15-08-1996
		DE 68926892 D	05-09-1996
		DE 68926892 T	06-02-1997
		ES 2092995 T	16-12-1996
		JP 2084169 A	26-03-1990
JP 62265992 A	18-11-1987	JP 2755421 B	20-05-1998
		KEINE	

EPO FORM P-481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**